

HER2 와 EGFR 이 과발현된
유방암에서 shTGF β 1 과
decorin 을 발현하는
종양 선택적 살상
아데노바이러스의 항종양 효과

연세대학교 대학원
의과학과
제 수 연

HER2 와 EGFR 이 과발현된
유방암에서 shTGF β 1 과
decorin 을 발현하는
종양 선택적 살상
아데노바이러스의 항종양 효과

지도교수 김 주 향

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2014년 12월

연세대학교 대학원

의과학과

제 수 연

제수연의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____김 주 항_____인

심사위원_____송 재 진_____인

심사위원_____윤 호 근_____인

연세대학교 대학원

2014년 12월

감사의 글

실험실에 들어온 지 얼마 되지 않은 것 같은데 벌써 졸업을 앞두고 감사의 글을 쓰게 되어 감회가 새롭습니다. 많은 분들의 도움으로 제가 무사히 졸업을 할 수 있었습니다. 이 글을 통해 조금이나마 그분들께 감사한 마음을 전하고자 합니다.

먼저 부족한 저를 학생으로 받아주시고 많은 것을 배울 수 있는 기회를 주신 김주향 교수님께 감사 드립니다. 그리고 실험에 대한 방향을 제시해 주시고 조언과 칭찬으로 열심히 할 수 있도록 도와 주신 송재진 교수님께도 감사 드립니다. 또한, 제 논문을 심사하시면서 제 연구 방향에 대한 조언과 격려를 아끼지 않으셨던 윤호근 교수님께도 감사 드립니다.

처음 암 연구소에 들어왔을 때 설렘보다는 걱정이 앞섰지만 좋은 실험실 선배들과 동료들을 만나서 힘든 대학원생활도 즐겁게 할 수 있었고, 함께 했던 이 시간들이 좋은 추억으로 남을 것 같습니다. 실험실의 만언니로써 항상 후배들을 아껴주고 챙겨주며 더 많은 것을 알려주려고 노력하는 마음이 따뜻한 소영언니, 동물실험을 가르쳐 주시고 실험에 대한 많은 조언을 해주시던 동욱선생님, 성실하며 친절하신 철수선생님, 그리고 지금은 졸업해서 다들 실험실에 없지만 첫 사수로써 실험실에 적응할 수 있게 도와주고 짧은 시간 동안 열심히 알려준 세은언니, 두번째 사수로써 아껴주고 챙겨주며 항상 친절하게 알려주던 지나언니, 항상 막내라고 챙겨주고 실험 노하우를 많이 알려주던 자상한 수진언니, 서로 격려하고 의지하며 같이 배우고 공부하던 정 많고 마음 따뜻한 은경언니, 대학교 친구로써 실험실 적응하는데 많은 도움을 주고 서로 격려하며 의지하던 승하까지 모두에게 진심으로 감사 드립니다.

제가 어떠한 선택을 하더라도 언제나 저를 응원해 주시고 격려해 주시며 지지해 주신 저희 부모님, 너무 사랑하고 감사 드립니다. 또한, 항상 제 편이 되어주고 응원해주는 속 깊고 마음 따뜻한 동생 가연이, 너무 고맙고 사랑합니다.

그리고 마지막으로 제가 슬플때나 기쁠때나 항상 옆에 있어주고 아껴준 병주오빠, 진심으로 고맙습니다.

암연구소에서 보낸 시간들은 제가 앞으로 살아가는데 있어서 커다란 밑거름이 되고 소중한 추억으로 남을 것 같습니다. 여기서 배운 것들을 토대로 사회에 나가서 더 많은 것을 배우고 겪으며 성숙한 사람이 되도록 노력하겠습니다.

제수연 씬

<차례>

국문요약.....	1
I. 서론.....	4
II. 재료 및 방법	9
1. 세포 배양.....	9
2. 바이러스 제작 및 생산.....	9
3. HER2 유전자를 도입시킨 유방암 세포주 제작.....	13
4. Real-time PCR.....	15
5. 효소결합면역흡착검사(ELISA).....	16
6. Western blot.....	16
7. 군락형성분석 (Clonogenic assay).....	18
8. 면역침강법 (Immunoprecipitation).....	18
9. 사람 종양 모델이 확립된 마우스에서 생체 내 항종양 효 과 검증.....	19
10. 면역조직화학염색 (Immunohistochemistry).....	19
11. 통계 처리.....	20
III. 결과.....	21
1. HER2 유전자를 도입시킨 유방암 세포주 제작 및 세포의 증식능과 세포 내 신호전달 변화 확인.....	21
2. HER2 유전자를 도입시킨 유방암 세포주에서 TGFβ1 과 TGFβ2의 발현량과 shTGFβ1과 shTGFβ2 아데노바 이러스의 효과 확인.....	27

3. TGF β 1 과 EGF ligand 사이의 상관관계.....	37
4. HER2 유전자를 도입시킨 유방암 세포주에서 decorin 아데노바이러스의 효과 확인.....	42
5. Decorin 의 발현을 유도하고, TGF β 1 의 발현을 감소 시키는 아데노바이러스 제작 및 효과 확인.....	46
6. 동물실험을 통한 항종양 효과 확인.....	49
IV. 고찰.....	53
V. 결론	58
참고문헌.....	59
Abstract.....	63

그림 차례

그림 1. MCF7과 MDAMB231에 HER2 유전자를 도입시킨 유방암 세포주의 HER2 발현량 확인 및 MCF7, MDAMB231과 각각의 HER2 유전자를 도입시킨 유방암 세포주에서 세포 내 신호 전달 변화 비교.....	23
그림 2. MCF7, MDAMB231 과 각각의 HER2 유전자를 도입시킨 유방암 세포주에서 군락형성능 확인.....	25
그림 3. EGFR 과 HER2 를 둘 다 발현하는 BT474 에서 HER2 의 발현을 감소시킨 뒤 세포 내 신호 전달 변화 확인.....	26
그림 4. HER2 유전자를 도입시킨 두 유방암 세포주에서 TGF β 1 과 TGF β 2 의 mRNA 발현량 확인.....	28
그림 5. TGF β 1 의 발현을 억제하는 복제 불능 아데노바이러스 제작 및 효과확인.....	29
그림 6. TGF β 2 의 발현을 억제하는 복제 불능 아데노바이러스 제작 및 효과확인.....	31
그림 7. HER2 유전자를 도입시킨 두 유방암 세포주에서 shTGF β 1 과 shTGF β 2 바이러스 처리시 세포 내 신호전달 변화 비교	35

그림 8. MDAMB231 에 HER2 유전자를 도입시킨 세포주에서 shTGFβ1 과 shTGFβ2 바이러스 처리 후 군락형성능확인.....	36
그림 9. MCF7, MDAMB231 과 각각의 HER2 유전자를 도입시킨 유방암 세포주에서 EGF ligand 발현량 확인.....	38
그림 10. shTGFβ1 바이러스 처리시 EGF ligand 발현량 확인.....	39
그림 11. 외부에서 EGF 단백질 처리시 rewiring 확인.....	40
그림 12. EGFR과 decorin의 결합 확인 및 decorin의 TGFβ1 억제제로서의 효과 확인.....	44
그림 13. Decorin 바이러스 처리시 혈관형성관련 인자의 발현량 확인.....	45
그림 14. Decorin 과 shTGFβ1 을 발현하는 복제불능 아데노바이러스 제작 및 효과 확인.....	47
그림 15. 종양 선택적 살상 아데노바이러스 제작 및 동물실험에서의 효과.....	51

<국문요약>

HER2와 EGFR이 과발현된 유방암에서 shTGF β 1과 decorin을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 항종양 효과

Decorin은 small leucine-rich proteoglycan으로 종양의 혈관형성을 억제하고 바이러스의 확산을 도와주는 역할을 하며, EGFR(epidermal growth factor receptor)과 HER2(human epidermal growth factor receptor 2)에 작용하여 하위 신호전달을 억제하는 작용을 한다. TGF β (transforming growth factor β)는 정상세포나 초기 암세포에서 세포의 성장과 분화를 억제하지만 진행된 암에서는 성장과 전이를 촉진하고, 특히 유방암에서는 RTK(receptor tyrosine kinase) 중 EGFR과 HER2의 활성을 돕는 역할을 한다. 따라서 본 연구에서는 아데노바이러스를 이용하여 decorin과 shTGF β 1 유전자를 전달하여 EGFR과 HER2를 통한 암의 증식과 생존에 관련된 신호전달을 차단하고 혈관형성을 억제하며 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 확산을 증가시킬 때 항종양 효과의 개선 여부를 확인하고자 본 연구를 진행하였고 다음과 같은 결과를 얻었다. EGFR을 과발현하는 MCF7과 MDAMB231 유방암 세포주에 HER2 유전자를 넣어 세포주를 제작하였고, Western blot을 시행하여 HER2 유전자를 도입시킨 두 유방암 세포주 모두에서 암의 증식과 생존에 관련된 신호의 발현량과 EGFR이 증가한 것을 확인하였다. 또한 군락형성분석(clonogenic assay)을 시행하여 기존의 세포주보다 HER2 유전자를 도입시킨 유방암 세포주

에서 증식능력이 더 강한 것을 확인하였다. 위의 결과를 확인하기 위한 방법으로 원래 두 수용체를 가지고 있는 BT474 세포에 shHER2 바이러스를 처리한 뒤 Western blot을 수행하여 암의 증식과 생존에 관련된 모든 인산화된 신호들의 발현량과 EGFR이 감소하는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과를 바탕으로 EGFR과 HER2는 서로의 발현량에 영향을 미치고, 두 수용체가 발현되었을 때 암의 증식과 생존에 관련된 신호전달이 강해지고 증식능력이 증가하는 것을 확인하였다. 그리고 MDAMB231에 HER2를 도입시킨 세포주에서 shTGF β 1 바이러스가 shTGF β 2 바이러스보다 더 효과적으로 세포의 증식을 감소시키는 것을 확인하였다. 또한 EGFR과 HER2에 작용하는 주된 ligand인 EGF(epidermal growth factor)가 기존 세포주에 비해 HER2 유전자를 도입시킨 유방암 세포주에서 발현량이 증가되어있고, 특히 MDA MB231에 HER2 유전자를 도입시킨 세포주에서 현저히 많은 EGF가 발현되어 있는 것을 확인하였다. MDAMB231에 HER2 유전자를 도입시킨 세포주에 shTGF β 1 바이러스를 처리하면 EGF의 발현량이 급격히 감소하는 것을 ELISA로 확인하였고, shTGF β 1 바이러스를 처리하여 EGF의 발현량이 낮아졌을 때 외부에서 EGF를 넣어주면 하위 신호들이 다시 활성화되는 것도 확인하였다. 이것으로 EGFR과 HER2에 작용하는 주된 ligand는 EGF이고 이 EGF는 TGF β 1에 의해 조절된다는 것을 확인하였다. 또한 면역침강법(Immunoprecipitation)을 수행하여 decorin이 EGFR에 결합하는 것을 확인하였고, decorin 발현 아테노바이러스를 처리하면 TGF β 1의 mRNA가 감소하는 것을

real-time PCR로 확인하였다. 따라서 decorin은 EGF에 경쟁적 억제제로써 EGFR에 작용하여 하위 신호전달을 억제하고 그 결과 TGF β 1의 유전자 발현(gene expression)을 감소시킨다는 결과를 얻었다. 그 다음으로 decorin이 혈관형성인자인 VEGFA(vascular endothelial growth factor A)와 HIF1 α (hypoxia-inducible factor 1- α)의 발현량을 감소시키는 것을 확인하였고, 따라서 decorin이 혈관형성을 억제한다는 사실을 증명하였다. 위와 같은 결과를 바탕으로 decorin과 shTGF β 1을 동시에 발현하는 아데노바이러스를 제작하여 decorin을 발현시키고, 효과적으로 TGF β 1의 mRNA를 감소시키는 것을 확인하였다. 생체 내에서 이와 같은 역할들에 의해 항종양 효과가 있는지 확인하기 위하여 종양 선택적 살상 아데노바이러스들을 제작하여 동물실험을 진행하였다. Decorin, shTGF β 1을 탑재한 각각의 종양 선택적 살상 아데노바이러스 그리고 decorin과 shTGF β 1 두 유전자를 탑재한 종양 선택적 살상 아데노바이러스는 모두 대조군 (PBS, NC)에 비해 종양의 크기를 줄이는데 효과가 있어 보였다. 그러나 세 바이러스 그룹간에 항종양 효과의 차이는 볼 수 없었다.

핵심되는 말 : EGFR, HER2, EGF, TGF β 1, Decorin, Oncolytic adenovirus

HER2 와 EGFR 이 과발현된 유방암에서
shTGF β 1 과 decorin 을 발현하는
종양 선택적 살상
아데노바이러스의 항종양 효과

<지도교수 김 주 항>

연세대학교 대학원 의과학과

제 수 연

I. 서론

유방암은 세계적으로 여성암 중 발생빈도가 가장 높고, 사망률이 높은 암이다.¹ 급속히 진행되는 유방암 중 30% 이상은 RTK 의 하나인 HER2 가 과발현되어 있으며, 이것은 환자의 좋지 않은 예후와 상관관계가 있다.² 특히 EGFR 이 존재하는 상태에서 HER2 의 과발현은

악성 종양으로의 진행을 촉진할 수 있어 더욱 안 좋은 예후를 나타낸다.^{3,4}

현재 시행되고 있는 암의 치료방법에는 수술, 항암제치료, 방사선 치료 등이 있으나 이러한 치료방법에는 한계가 있다. 따라서 이러한 치료방법에 대한 한계를 극복하기 위한 방안으로 유전자 치료에 대한 관심이 대두되고 있다.⁵

유전자 치료는 유전적 이상으로 생긴 질병이 있는 사람에게 정상적인 유전자를 넣어주거나 결함이 있는 부분을 교정해주는 방식으로 연구되고 있는데, 암 또한 유전자 이상으로 인한 질병이라는 것이 밝혀짐으로써 암을 치료하기 위해서 유전자 치료를 이용하는 연구가 활발해졌다. 유전자를 암세포에 전달하기 위해서는 전달체가 필요한데, 그 전달체로는 리포좀, 성체줄기세포, 바이러스 등이 있다. 특히, 바이러스 중에서 아데노바이러스는 다른 전달체에 비해서 안정적이고, 암을 유발하지 않고, 분열세포와 비분열세포 모두에 감염이 가능하다는 장점들을 가지고 있어서 유전자 전달체로 많이 사용되고 있다.^{6,7}

아데노바이러스는 바이러스 복제에 필요한 역반복서열, 포장신호, 초기발현 유전자 그리고 후기발현 유전자 등으로 이루어져 있다. 그 중에서 초기발현 유전자에 속하는 E1A 는 아데노바이러스가 감염 후 가장 먼저 발현하는 단백질으로써 바이러스 복제에 필수적이다. E1A 단백질은 세포를 S 주기로 가도록 하여 세포 내에서 아데노바이러스가 증식할 수 있게 한다. 따라서 E1A 의 유무에 따라 아데노바이러스의 복제여부가 조절될 수 있다.^{8,9} E1B 는 E1A 와 같이 초기발현 유전

자에 속하며 E1B19kDa 와 E1B55kDa 두 종류의 단백질로 구분된다. 그 중 E1B55kDa 는 p53 과 결합하여 p53 의 기능을 불활성화 시킨다고 알려져 있다. 이러한 E1B55kDa 의 역할로 인하여 아데노바이러스가 세포에 감염되었을 때 세포고사가 일어나는 것을 막아 세포 내에서 아데노바이러스가 증식할 수 있게 한다.^{10,11} 그러나 p53 은 암의 50%정도에서 유전자 변이가 일어나 불활성화되어 있는 것으로 발견된다. 따라서 E1B55kDa 가 결합된 아데노바이러스를 유전자 전달체로 이용할 경우 정상세포에서는 p53 이 정상적으로 활성화되어 바이러스의 증식을 억제하지만 p53 에 변이가 일어난 암세포에서는 p53 의 기능이 불활성화되어 있으므로 바이러스의 증식이 가능하게 된다.¹²⁻¹⁴

암세포는 스스로 영양분과 산소를 조달하기 위하여 혈관을 형성하는데 형성된 혈관을 통한 영양분과 산소의 공급은 암세포의 성장을 촉진시킬 뿐만 아니라 혈관을 통해서 암세포의 전이가 이루어 지기도 한다.¹⁵ Proteoglycan 들은 세포 표면의 ligand 나 수용체에 결합하여 하위 신호체계에 영향을 끼쳐 종양의 혈관형성을 억제한다고 알려져 있다.¹⁶ 그 중에서도 decorin 은 small leucine-rich proteoglycan 으로 VEGFA 와 같은 혈관을 형성하는데 필요한 요소를 억제함으로써 종양의 혈관형성을 억제한다고 보고되어 있다.¹⁷⁻¹⁹ 또한 decorin 은 암의 성장과 전이를 돕는 TGF β 의 활성을 억제함으로써 간접적으로 암의 성장을 지연시킨다는 연구가 있다.²⁰ 유방암에서 암세포의 공격적인 성향은 RTK 의 활성과 발현량 정도에 따라 상관관계가 있다고 밝혀

졌고, decorin은 RTK 중 특히 EGFR 의 ligand 로써 유방암에서 흔히 형성되는 RTK 의 EGFR-EGFR 결합 수용체(EGFR homodimer)나 EGFR-HER2 결합 수용체(EGFR-HER2 heterodimer)에 작용하여 각각의 하위 신호체계의 신호전달을 억제하는 작용을 한다. 이러한 신호전달의 억제는 암세포의 성장촉진과 세포가 퍼져나가거나 이동하는 현상을 억제한다.²¹⁻²⁴ 또한 decorin 은 아데노바이러스의 확산에 도움을 주어 바이러스의 효율을 높인다고 알려져 있다.²⁵

TGF β 는 정상세포 또는 초기 암세포 에서는 세포의 성장과 분화를 억제하는 사이토카인으로써 역할을 하지만, 암이 진행된 상태에서는 반대로 암의 성장과 전이를 돕는 사이토카인으로써 역할을 한다.^{26,27} 대부분의 암세포는 TGF β 를 과 발현하는 것으로 알려져 있고, 특히 유방암에서는 TGF β 가 EGFR, HER2 등의 RTK 의 활성을 돕는 것으로 보고되어있다.²⁸⁻³¹ 그리고 TGF β 는 TGF β 수용체에 결합하여 신호를 전달함으로써 EGFR-EGFR 결합 수용체나 EGFR-HER2 결합 수용체에 결합할 수 있는 EGF, TGF α 와 같은 ligand 들의 분비를 돕고, 분비된 ligand 들은 수용체에 결합하여 암세포의 전이와 성장을 유도하는 하위 신호체계의 신호전달을 유도한다.^{2,32} TGF β 는 TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3 로 나뉘어 진다.³³

짧은 가닥의 RNA 가 상보적으로 결합할 수 있는 mRNA 와 결합하여 분해 시킴으로써 특정 단백질의 합성을 저해하는 현상을 RNA interference 라고 한다. 그 중에서도 small interference RNA(siRNA)는 dicer 라 불리는 효소에 의해 이중가닥의 RNA 가 절단되어 생성된다.

그 이중가닥은 sense 와 antisense 로 분리되며, sense 는 분해되고 antisense 는 RNA induced silencing complex(RISC)에 의해 특정 mRNA 에 결합하여 분해시키는 작용을 한다.^{34,35} siRNA 를 이용하여 암세포에서 특이적으로 발현되는 유전자의 발현을 억제시키면 좋은 치료효과를 얻을 수 있을 것으로 기대되나 siRNA 의 큰 단점인 불안정성 때문에 쉽게 분해되어 체내에서 오래 유지되지 못한다.

이러한 내용들을 바탕으로 본 연구에서는 암세포로 유전자를 효율적으로 전달하기 위하여 아데노바이러스를 전달체로 이용하였고, 암세포의 혈관형성 및 성장과 전이를 억제하기 위한 decorin 그리고 암의 성장과 전이를 돕는 사이토카인인 TGF β 를 억제하기 위하여 siRNA 의 단점을 보완할 수 있는 siRNA 의 전구체인 small hairpin RNA(shRNA)를 아데노바이러스 전달체에 탑재하였다. 이 아데노바이러스는 decorin 과 shTGF β 1 을 전달하는 역할뿐만 아니라 암세포를 선택적으로 살상하는 항암효과를 가지게 하였다. 따라서 암세포 내에서 decorin 을 발현시키고 TGF β 1 의 발현은 억제시켜 혈관형성과 성장, 전이를 막아주고, 바이러스를 확산시켜 아데노바이러스에 의한 암세포의 살상을 유도할 때 항암효과의 개선여부를 규명하고자 본 연구를 계획하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포 배양

293A(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), MDAMB231, MCF7, BT474(ATCC, Manassas, VA, USA) 세포주는 DMEM배지(HyClone, Logan, Utah, USA)를 사용하여 배양하였고, 각 배지에는 10% 우태아 혈청과 10unit/ml의 Penicillin-Streptomycin, 25mM의 HEPES(HyClone)를 첨가하여 사용하였다. 각 세포는 5% CO₂ 를 유지하는 37℃ 항온 배양기에서 배양하였다.

2. 바이러스의 제작 및 생산

(1) 증식 불능 아데노바이러스 제작

가) Human decorin의 발현을 증대시키는 아데노바이러스 제작
pORF-human decorin(Invivogen, Sendiego, CA, USA)으로부터 PCR을 통해 decorin 유전자를 증폭시킨 후 증폭된 유전자와 pCA14에 *Xho* I, *Eco*RV 제한효소를 처리하여 서플벡터에 삽입하였다. pCA14-human decorin 서플벡터와 dl324-*Bst*BI 아데노바이러스의 E1 부분에 상동 재조합을 통해 증식 불능 아데노바이러스 dl324 -human decorin을 제작하였다.

나) Human TGFβ1과 human TGFβ2, human HER2의 발현을 감소시키는 아데노바이러스 제작

Human TGFβ1과 human TGFβ2, human HER2의 발현을 감소시키는 아데노바이러스를 제작하기 위해 Genolution사

(Genolution, Seoul, Korea)에 shRNA를 의뢰하여 human TGF β 1과 human TGF β 2, human HER2의 mRNA 발현을 감소시키는 shRNA를 각각 선정하였다. 이 shRNA를 *Bam*HI 과 *Hind*III(New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) 제한효소로 처리한 pSP72 Δ E3 서플벡터에 삽입하였으며 dl324-IX 아데노바이러스 유전자와 상동재조합을 하여 증식 불능한 dl324-human shTGF β 1과 dl324-human shTGF β 2, dl324-human shHER2 아데노바이러스를 제작하였다.

다) Human decorin의 발현을 증대시키고, human TGF β 1의 발현은 감소시키는 아데노바이러스 제작

pSP72 Δ E3 서플벡터에 삽입된 human shTGF β 1을 dl324-*Bst*BI 아데노바이러스의 E3 부분에 상동 재조합을 통해 벡터를 제작 한 후 pCA14-human decorin 서플벡터와 벡터를 아데노바이러스의 E1 부분에 상동재조합을 통해 증식 불능 아데노바이러스 dl324 -human decorin-human shTGF β 1을 제작하였다.

(2) 종양 선택적 살상 아데노바이러스 제작

가) Human decorin의 발현을 증대시키는 아데노바이러스 제작

먼저 아데노바이러스의 E1 부분에 유전자를 넣기 위하여 서플벡터를 제작하였다. E1A와 E1B55kDa 유전자를 포함하며 다양한 제한효소 인식부위를 포함하는 pBSKII-3484 합성유전자를 제작하였다. 3484란 아데노바이러스의 앞쪽 유전자인 ITR와 packing signal, E1A, E1B55kDa의 유전자 길이인 3484bp (base pair)를

말한다. 상동재조합이 용이한 pCA14-3484 형태로 바꾸기 위하여 이 합성 유전자를 ITR부터 E1A까지 *Hind*Ⅲ, *Eco*RⅠ 제한효소로 처리한 뒤, pCA14도 같은 제한효소로 처리하여 합성된 유전자를 삽입함으로써 서틀벡터를 제작하였다. pORF-human decorin(Invivogen, Sendiego, CA, USA)으로 부터 PCR을 통해 decorin 유전자를 증폭시킨 후 증폭된 유전자를 pCA14-3484에 *Xho*Ⅰ, *Eco*RⅤ 제한효소를 처리한 후 삽입하여 서틀벡터를 만들었다. 여기에 pCA14-3484-human decorin 서틀 벡터와 dl324-*Bst*BⅠ 아데노바이러스를 E1부분에 상동재조합을 통해 종양을 선택적으로 살상하면서 decorin을 발현하는 아데노바이러스를 제작하였다.

나) Human TGFβ1의 발현을 감소시키는 아데노바이러스 제작

Human TGFβ1의 발현을 감소시키는 아데노바이러스를 제작하기 위해 Genolution사(Genolution, Seoul, Korea)에 shRNA를 의뢰하여 human TGFβ1의 mRNA 발현을 감소시키는 shRNA를 각각 선정하였다. 이 shRNA를 *Bam*HⅠ과 *Hind*Ⅲ(New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) 제한효소로 처리한 pSP72△E3 서틀 벡터에 삽입하였으며 dl324-*Bst*BⅠ 아데노바이러스 유전자와 E3부분에 상동재조합을 하였다. E1B55kDa가 결함되고 E1A를 발현하는 pCA14-3484 서틀벡터와 dl324-*Bst*BⅠ-△E3-shTGFβ1 아데노바이러스의 E1부분에 상동재조합을 통해 종양을 선택적으로 살상하면서 TGFβ1의 발현을 감소시키는 아데노바이러스를 제작하였다.

다) Human decorin의 발현을 증대시키고 human TGF β 1의 발현은 감소시키는 아데노바이러스 제작

증식 불능 아데노바이러스 dl324-human decorin과 증식 불능 아데노바이러스 dl324-human shTGF β 1에 대한 각각의 효과를 확인한 후 decorin과 shTGF β 1를 발현하면서 종양 선택적으로 세포를 살상하는 아데노바이러스를 제작하였다. dl324-*BstBI* 아데노바이러스와 pSP72 Δ E3 서플렉터를 아데노바이러스의 E3 부분에 상동재조합을 시켜서 dl324-*BstBI* - Δ E3-shTGF β 1을 제작하였고, 여기에 pCA14-3484-human decorin 서플렉터와 dl324-*BstBI* - Δ E3-shTGF β 1 아데노바이러스의 E1부분에 상동재조합을 통해 종양을 선택적으로 살상하면서 decorin을 발현하고 human TGF β 1의 발현을 억제하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스를 제작하였다.

제작된 모든 바이러스들은 293A세포에 Lipofectamin을 이용하여 유전자 도입을 한 후 cytopathic effect(CPE)가 생성되면 293A 세포를 이용하여 바이러스를 증식시켰다. 증식된 바이러스는 세슘에 의한 밀도구배를 이용하여 농축하고 10mM Tris-HCl (PH 8.0)을 통해 2시간 동안 총 2회 투석하고 저장완충용액 (10mM Tris-HCl, 4% sucrose, 2mM MgCl₂)에서 2시간 동안 투석한 후 -80℃ 냉동고에 저장하였다. 바이러스 농도는 end-point dilution assay를 이용하여 각 well에서 생성된 CPE개수를 세어 계산하였다. 293A 1X10⁴개의 세포를 96well plate의 각 well에 5%

우태아 혈청을 함유한 DMEM배지를 이용하여 분주하고 다음날 10^{-7} 에서 10^{-14} 으로 희석시킨 바이러스를 각 well에 감염시켰다. 감염 후 8일 동안 형성된 CPE 개수를 세고 다음과 같은 공식을 이용하여 바이러스의 농도를 구하였다.

$$\text{농도(titer)} = 1 \times 10^{(\text{CPE 생긴 well 개수}/10 + 5.5) + 0.3} \times 20 \text{ Plaque Forming Unit(PFU)/ml}$$

3. HER2 유전자를 도입시킨 유방암 세포주 제작

(1) pcDNA3.1Hygro+ HER2 plasmid 제작

HER2를 발현하는 plasmid를 제작하기 위하여 pcDNA3 HER2 plasmid와 pcDNA3.1Hygro+ plasmid를 *Not* I, *Xba* I 제한효소로 처리하여 선택유전자가 들어가있는 pcDNA3.1Hygro+ plasmid에 HER2를 삽입하였다.

(2) HER2 유전자를 발현하는 유방암 세포주 제작

MDAMB231, MCF7(ATCC, Manassas, VA, USA) 세포주에 Lipofectamin을 이용하여 pcDNA3.1Hygro+ HER2 유전자를 도입한 후 48시간 동안 배양하였다. 유전자가 도입된 세포를 100mm dish에 1/50, 1/10배로 희석하여 넣어준 후 7~10일 동안 배양하였다. Plasmid가 들어간 세포와 들어가지 않은 세포를 선택적으로 구별하기 위하여 배양액은 hygromycin이 포함된 DMEM배지(HyClone, Logan, Utah, USA)를 사용하여 배양하였다. 각 배지에는 10% 우태아 혈청과 10unit/ml 의 Penicillin-Strepto mycin, 25mM의 HEPES(HyClone)를 첨가하여 사용하였

다. 각 세포는 5% CO₂ 를 유지하는 37℃ 항온 배양기에서 배양하였다. 7~10일 뒤 plasmid가 들어간 세포는 hygromycin에 저항성을 가져 군락을 형성하였다. 각각의 군락들을 trypsin (Hyclone)을 처리하여 떼어낸 뒤 48well로 옮겨주었다. 이후에 12well, 6well 을 거쳐 세포의 양을 늘려준 뒤 75T flask에서 HER2가 발현되는 것을 Western blot으로 확인하였다.

(3) 대조군 유방암 세포주 제작

MDAMB231, MCF7(ATCC, Manassas, VA, USA) 세포주에 Lipofectamin을 이용하여 pcDNA3.1Hygro+ 유전자를 도입을 한 후 48시간 동안 배양하였다. 유전자가 도입된 세포를 100mm dish에 1/50, 1/10배로 희석하여 넣어준 후 7~10일 동안 배양하였다. Plasmid가 들어간 세포와 들어가지 않은 세포를 선택적으로 구별하기 위하여 배양액은 hygromycin이 포함된 DMEM 배지 (HyClone, Logan, Utah, USA)를 사용하여 배양하였다. 각 배지에는 10% 우태아 혈청과 10unit/ml 의 Penicillin-Streptomycin, 25mM의 HEPES(HyClone)를 첨가하여 사용하였다. 각 세포는 5% CO₂ 를 유지하는 37℃ 항온 배양기에서 배양하였다. 7~10일 뒤 plasmid가 들어간 세포는 hygromycin에 저항성을 가져 군락을 형성하였다. 각각의 군락들을 trypsin(Hyclone)을 처리하여 떼어낸 뒤 48well로 옮겨주었다. 이후에 12well, 6well 을 거쳐 세포의 양을 늘려주었다.

4. Real-time PCR

제작된 아데노바이러스가 표적 RNA를 감소시키는지 확인하기 위하여 real-time PCR을 이용하여 cycle threshold (Ct)값을 측정하여 비교하였다. 세포를 6 well에 각각 2×10^5 cell/well로 분주하여 배양한 후, 다음날 증식 불능 dl324-scrambled shRNA, dl324-human shTGF β 1를 각각 0에서 100까지 다양한 multiplicity of infection(MOI)별로 감염시킨 후, 이틀 후에 TRIzol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA는 PowerSYBR Green RNA-to-CT™ 1 Step Kit (Applied Biosystem, Foster, CA, USA)를 이용하여 cDNA 제작 및 PCR에 사용하였다. PCR은 각 well당 0.4 μ l의 RT-enzyme mix, 25 μ l의 RT-PCR mix, 10pmol의 forward, reverse primer를 각각 0.5 μ l씩, 50ng의 RNA를 넣어 최종 부피가 50 μ l가 되게 하여 반응시켰다. 반응조건은 48℃에서 30분간 역전사를 한 후 95℃에서 10분간 효소를 활성화 시키고 95℃에서 15초, 60℃에서 1분간 40회 반복하여 반응시켜서 증폭되는 유전자의 값을 AB real time PCR기계를 이용하여 Ct값을 측정하고 actin의 Ct값을 기준으로 값을 보정하여 알아보고자 하는 유전자의 발현량을 확인하였다.

5. 효소결합면역흡착검사 (ELISA)

각 바이러스를 처리하였을 때 여러 분비형 단백질의 분비정도를 측정하기 위해 ELISA를 시행하였다. 세포를 6well plate의 각 well당 2×10^5 개씩 분주하고 다음날 5%의 우태아 혈청이 함유된

DMEM배지를 이용하여 바이러스를 처리하였다. 다음날 혈청에 포함되어있는 사이토카인에 의해 분비된 단백질의 측정이 방해되지 않도록 혈청이 포함되지 않은 DMEM배지로 바꾸어 주었다. 무혈청 배지에서 24시간 동안 배양 후 세포를 배양했던 무혈청 배지를 거두어 분비된 단백질의 양을 측정하였다. 수거한 배지를 각 단백질에 맞는 항체가 부착된 well에 넣어 상온에서 두 시간 동안 반응시키고 항체에 부착하지 않은 단백질을 씻어내었다. 그 후 측정하고자 하는 단백질과 반응하면서 기질에도 반응할 수 있는 항체를 넣어 2시간 동안 상온에서 반응시켰다. 단백질과 반응하지 않은 나머지 항체를 씻어내고 빛을 차단한 상태에서 기질을 넣어 30분간 반응시켰다. 그 후 정지액을 넣어 반응을 정지시킨 후 micro plate reader (Molecular devices corporation, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450nm와 540nm에서 흡광도를 측정하였으며 표준용량곡선에 따라 분비된 각 단백질의 분비량을 구하였다. human TGF β 1, human TGF β 2, EGF ligand 모두 Quantikine ELISA kit (R&D, Minneapolis, MN, USA)를 이용하였으며 그에 맞는 설명서에 따라 시행하였다.

6. Western blot

각 바이러스에 의해 여러 단백질의 발현량 변화를 관찰하기 위하여 Western blot을 시행하였다. 비교하고자 하는 각 바이러스를 2×10^5 개의 세포에 감염시킨 후 2일 후에 1Xsample buffer (4% SDS, 20% glycerol, 0.004% bromophenol blue, 0.125M Tris-HCl)로 용해시킨 후 BCA Protein Assay Kit(Pierce,

Rockford, IL, USA)를 이용하여 정량하였다. 각 단백질을 well당 25 μ g씩 넣고 SDS-polyacrylamide gel(4% Stacking gel과 10% Running gel)을 이용하여 전기영동 후 transfer buffer(2.5mM Tris, 200mM Glycine, 30% Methanol)를 이용하여 PVDF membrane(Millipore, Billerica, MA, USA)으로 120V에서 2시간 동안 transfer를 진행한 후 blocking buffer(5% BSA in TBST)을 이용하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 5% BSA용액에 일차항체를 1:200-1:2000까지 각 항체에 맞게 희석하여 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 다음날 TBST로 15분간 3번 세척하고 각 일차항체에 맞는 이차항체를 5% BSA용액에 1:2000으로 희석한 후 상온에서 1시간 동안 반응시키고 다시 TBST로 10분간 3번 세척하였다. 항체가 붙어있는 membrane을 detection kit(ELPIS biotech, Taejon, Korea)을 이용하여 반응시킨 후 chemiluminescence(Syngene, Frederick, MD, USA)을 이용하여 각 바이러스를 처리하였을 때 달라진 단백질의 발현양을 확인하였다. 이 과정에 사용한 항체는 decorin, β -actin, Src, Hsp27 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), HER2, phospho-HER2, EGFR, phospho-EGFR, ERK, phospho-ERK, phospho-Src, stat3, phospho-stat3, Akt, phospho-Akt, p38, phospho-p38, phospho-Hsp27, p65, phospho-p65 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)이었다.

7. 군락형성분석 (Clonogenic assay)

MDAMB231, MCF7에 HER2 유전자를 도입시켰을 때 증식 및

생존에 어떠한 영향을 줄 수 있는지 확인하기 위하여 군락형성 분석을 시행하였다. 6well에 세포를 1×10^3 개 분주한 다음 날 배양액을 5% 우태아 혈청을 함유한 DMEM배지로 바꿔 준다. 이틀에 한 번씩 배양액을 바꿔주고, 1주 후에 군락형성 정도를 알아보기 위하여 배양하던 배지를 제거 후 4% paraformaldehyde를 상온에서 5분간 처리하여 고정시키고 0.05% crystal violet을 이용하여 1시간 동안 염색 후 물로 세척하여 염색된 세포를 관찰하였다.

8. 면역침강법 (Immunoprecipitation)

EGFR이 decorin과 결합하는지 확인하기 위하여 면역침강법을 시행하였다. HER2 유전자를 도입시킨 세포주를 100mm dish에 4×10^6 개 분주한 다음날 5% 우태아 혈청을 함유한 DMEM배지를 이용하여 바이러스를 50MOI 처리하였다. 바이러스처리 5시간 후 배양액을 다시 5% 우태아 혈청을 함유한 DMEM배지로 바꿔주었다. 2일 후에 400 μ l의 RIPA buffer(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)로 용해시킨 후 10분 동안 얼음에 두고 상층액만 분리하여 1차항체와 bead를 각 시료에 넣고 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 다음날 13200rpm에 5분동안 침전시킨 뒤 침전물을 RIPA buffer로 5번 씻어내고 1Xsample buffer(4% SDS, 20% glycerol, 0.004% bromophenol blue, 0.125M Tris-HCl)를 30 μ l 넣어 섞어준 뒤, 95℃에서 10분간 변성시킨 뒤 위에 서술한 Western blot을 진행하였다.

9. 사람 종양 모델이 확립된 마우스에서 생체 내 항종양 효과검증

10% 우태아 혈청을 함유한 DMEM 배지에서 monolayer로 배양한 유방암 세포를 0.25% Trypsin-EDTA(HyClone, Logan, Utah, USA)로 처리한 후 $1 \times 10^7/100\mu\text{l}$ 의 생존세포를 Hanks' balanced salt solution(HBSS)로 부유하여 암컷인 BALB/c nude 마우스 복벽에 피하주사하였다. 암세포이식 후 7일 동안 암이 형성될 때까지 관찰하면서 기다렸다. 암세포이식 후 7일경, 암의 크기가 50mm^3 정도로 성장하였을 때 PBS, 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 dl324-sh scrambled, dl324-human decorin, dl324-human shTGF β 1, dl324-human decorin-human shTGF β 1을 각각 1×10^8 PFU/50 μl 용량으로 2일에 한 번씩 총 3회 종양 내로 투여하였다. 종양의 크기는 종양의 최장경(a)과 최장경에 수직한 최단경(b)을 각각 측정하여 $a \times b^2 \times 0.523$ 의 공식으로 산출하였다.

10. 면역조직화학염색 (Immunohistochemistry)

마우스에 형성된 암 조직을 적출하여 10% formaldehyde에 넣어 상온에서 고정시킨 뒤 70% 에탄올에 탈수를 시켜 파라핀에 넣어 굳혀서 블록을 만들어 4 μm 의 두께로 잘라 유리 슬라이드 위에 올려 xylene과 100%, 90%, 70% 에탄올로 수화시킨 뒤 면역조직염색을 시행하였다. 이후 0.4% H₂O₂용액에서 10분간 반응시켜 내인성 과산화 효소의 작용을 차단시킨 후 일차항체인 rabbit-anti-adenovirus type 5 항체 (Abcam, Cambridge,

CB40FL, UK)를 넣어 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 이후 horseradish peroxidase(HRP)가 결합된 이차항체인 anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)을 넣어 상온에서 30분간 반응시키고 3,3'-Diaminobenzidine(DAB)을 첨가하여 발색정도를 지켜본 후 Harris hematoxyline(BBC Biochemical corporation, Stanwood, WA, USA)로 1-3분간 핵을 염색한 후에 70%, 90%, 100% 에탄올과 xylene 용액에 침전시키고 커버글라스를 덮어 관찰하였다.

11. 통계 처리

Graphed PRISM 6.0을 이용하여 그래프 작성 및 t-test를 사용하여 실험결과의 유의성있는 차이를 표시하였다.

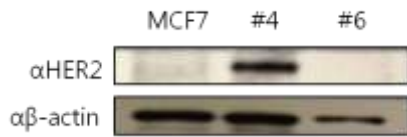
III. 결과

1. HER2 유전자를 도입시킨 유방암 세포주 제작 및 세포의 증식능 과 세포 내 신호전달 변화 확인

먼저 EGFR 과 HER2 가 둘 다 발현되는 세포주를 만들기 위하여 EGFR 만 발현되는 MCF7 과 MDAMB231 유방암 세포에 HER2 유전자를 도입하여 세포주를 제작하였다(그림 1A, 1B). MCF7 에서 #4 의 세포주가 HER2 를 발현하고(그림 1A), MDAMB231 에서도 #2 의 세포주가 HER2 를 발현하는 것을 확인하였다(그림 1B). 이 세포주들을 이용하여 다음 실험을 진행하였다. 기존의 유방암 세포주와 HER2 유전자를 도입시킨 유방암 세포주 사이의 세포 내 신호전달 변화 확인을 위하여 Western blot 을 시행하였다(그림 1C, 1D). MCF7 #4 세포주에서는 phospho-HER2, phospho-EGFR, phospho-Src, phospho-ERK, phospho-Akt 의 발현량이 증가한 것을 확인할 수 있었고(그림 1C), MDAMB231 #2 세포주에서는 phospho-HER2, phospho-EGFR, phospho-Src, phospho-ERK 의 발현량이 증가한 것을 확인할 수 있었다(그림 1D). HER2 유전자를 도입시킨 모든 유방암 세포주에서 암의 증식과 생존에 관련된 신호들이 증가된 것을 확인하였다. 세포의 증식능을 확인해 보기 위하여 군락형성분석을 통하여 기존의 유방암 세포주와 HER2 유전자를 도입시킨 유방암 세포주를 비교하였다(그림 2). MCF7 #4 세포주는 MCF7 모세포에 비해 군락형성을 훨씬 많이 하는 것으로 보아 증

식능이 많이 높아진 것을 확인할 수 있었다(그림 2A). 아래 사진은 각각의 well 을 40 배 확대한 것으로 사진상으로 보이지 않는 MCF7 모세포의 군락형성을 확인하였다. MDAMB231 #2 세포주도 MDA MB231 모세포에 비해 두 배정도 군락형성이 많이 되어있는 것으로 보아 마찬가지로 증식능이 많이 높아진 것으로 보인다(그림 2B). 다른 세포주의 증식능을 확인하기 위하여 EGFR 과 HER2 를 둘 다 발현하는 유방암 세포 BT474 에서 NC 바이러스와 HER2 의 발현을 감소시키는 복제 불능 shHER2 바이러스를 100 MOI 처리한 뒤, Western blot 을 시행하여 세포 내 신호전달 변화를 확인하였다 (그림 3). HER2 의 발현을 감소시켰더니 phospho-Src 을 제외한 인산화된 단백질 발현량들이 모두 감소한 것을 확인할 수 있었다. 따라서 EGFR 과 HER2 가 둘 다 발현되는 유방암 세포는 EGFR 이나 HER2 가 하나만 발현되는 세포들보다 생존과 증식에 관련된 단백질들의 활성이 높은 것을 확인하였다.

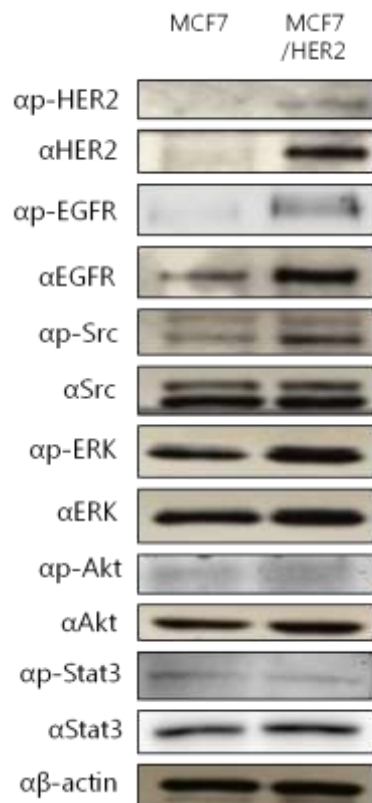
(A)



(B)



(C)



(D)

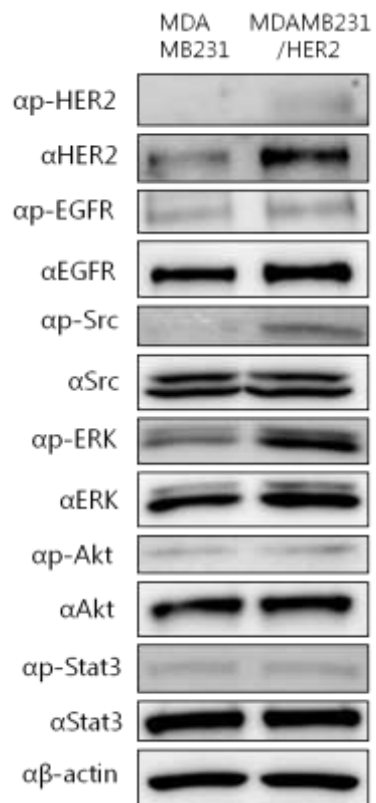


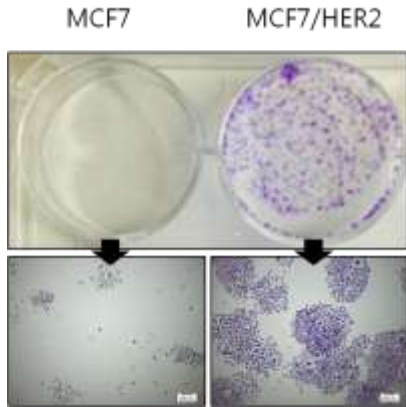
그림 1. MCF7과 MDAMB231에 HER2 유전자를 도입시킨 유방암

세포주의 HER2 발현량 확인 및 MCF7, MDAMB231과 각각의 HER2 유전자를 도입시킨 유방암 세포주에서 세포 내 신호전달 변화 비교

(A), (B) MCF7과 MDAMB231 유방암 세포에 pcDNA3.1 Hygro+ HER2 plasmid를 transfection한 후, 2일 후에 1/50, 1/10배로 희석하여 100mm dish에 hygromycin이 포함된 배양액을 사용하여 배양하였다. 7~10일 후 군락들이 형성되었을 때 trypsin을 사용하여 떼어낸 후 48well로 옮겨 배양한 뒤 6well, 25T, 75T flask로 옮겨 세포의 수를 늘렸다. 75T flask로 옮겨졌을 때 일부의 세포를 얻어 Western blot을 시행하여 각각의 세포에서 HER2가 발현되는지 확인하였다.

(C), (D) MCF7, MDAMB231과 각각의 HER2 유전자를 도입시킨 세포들을 6well에 2×10^5 cell/well로 배양시킨 후 이틀 뒤 세포를 얻어 Western blot을 시행하여 세포 내의 단백질량을 확인하였다.

(A)



(B)

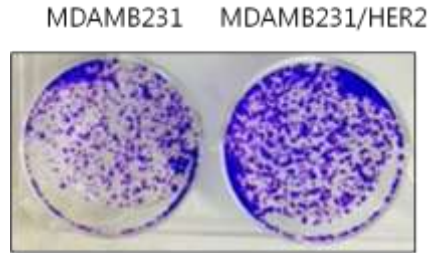


그림 2. MCF7, MDAMB231 과 각각의 HER2 유전자를 도입시킨 유방암 세포주에서 군락형성능 확인

MCF7, MDAMB231과 MCF7 #4, MDAMB231 #2 세포들을 6well에 3×10^4 cell로 분주하였다. 이틀에 한번씩 5% 우태아 혈청을 함유한 DMEM배지로 배양액을 바꿔주었다. 1주 후에 군락형성정도를 알아보기 위하여 배양액을 제거한 후 4% paraformaldehyde를 상온에서 5분간 처리하여 고정시켰다. 그리고 0.05% crystal violet을 이용하여 1시간 동안 염색 후 물로 세척하여 염색된 세포를 관찰하였다. 그림(A)의 아래 사진은 현미경을 이용하여 각각의 well을 40배 확대하여 본 것이다.

(Magification: X40)

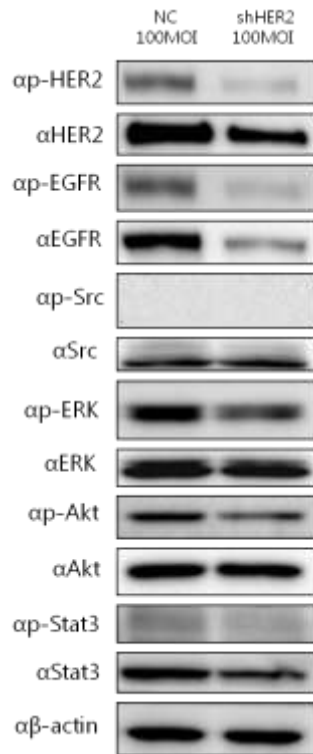


그림 3. EGFR 과 HER2 를 둘 다 발현하는 BT474 에서 HER2 의 발현을 감소시킨 뒤 세포 내 신호전달 변화 확인

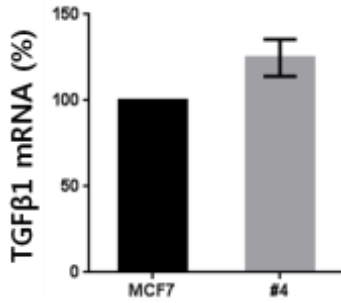
BT474를 6well에 2×10^5 cell/well로 배양시킨 후 다음날 증식 가능한 NC, shHER2 바이러스를 100MOI처리하였다. 바이러스 처리 5시간 후 배양액을 5% 우태아 혈청을 함유한 DMEM배지로 바꿔 주고, 이틀 뒤 세포를 얻어 Western blot을 시행하여 세포 내의 단백질량을 확인하였다.

<NC; dl324-sh scrambled, shHER2; dl324-human shHER2>

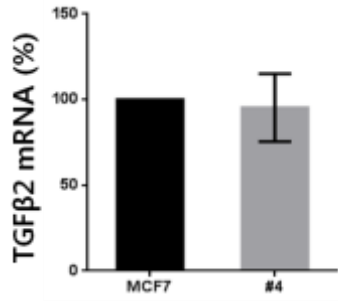
2. HER2 유전자를 도입시킨 유방암 세포주에서 TGF β 1 과 TGF β 2 의 발현량과 shTGF β 1 과 shTGF β 2 아데노바이러스의 효과 확인

MCF7 #4, MDAMB231 #2 세포주에서 TGF β 1 과 TGF β 2 의 mRNA 발현량을 real-time PCR 로 확인하였다. MCF7 #4 세포주에서는 TGF β 1 의 mRNA 발현량이 조금 증가하였다(그림 4A). MDAMB231 #2 세포주에서는 TGF β 1 과 TGF β 2 의 mRNA 발현량이 모두 증가하였다(그림 4C, 4D). 전체적으로 HER2 를 도입시킨 세포주에서 TGF β 의 mRNA 발현량이 증가한 것을 확인하였다. 이 결과를 바탕으로 TGF β 1 과 TGF β 2 의 발현을 감소시키는 실험을 진행하기 위하여 먼저 TGF β 1 의 발현을 억제시키는 아데노바이러스를 제작하고(그림 5A), MCF7 #4, MDAMB231 #2 세포주에서 효과를 확인해보았다(그림 5B~E). shTGF β 1 을 발현하는 아데노바이러스를 MCF7 #4, MDAMB231 #2 세포주에 MOI 별로 감염시켜 세포의 TGF β 1 mRNA 와 단백질 발현량을 감소시키는지 확인하기 위하여 real-time PCR 과 ELISA 를 각각 시행하였다. 두 세포주에서 모두 10MOI 를 처리하였을 때, 대조군보다 절반 이상의 mRNA 발현량이 감소한 것을 확인하였다. 50, 100MOI 에서는 바이러스양에 비례하여 더 많이 감소한 것으로 보였다(그림 5B, 5C). mRNA 발현량만큼은 아니지만 MOI 가 증가함에 따라 TGF β 1 의 단백질 발현량도 감소한 것을 확인할 수 있었다(그림 5D, 5E). 따라서 shTGF β 1 을 발현하는 아데노

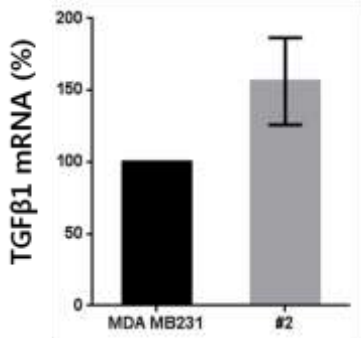
(A)



(B)



(C)



(D)

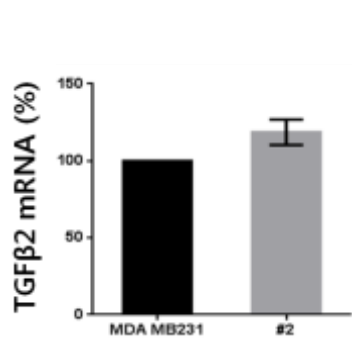


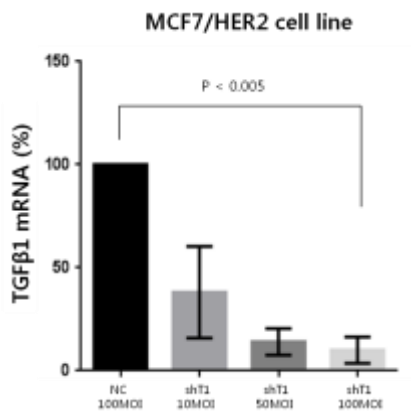
그림 4. HER2 유전자를 도입시킨 두 유방암 세포주에서 TGFβ1 과 TGFβ2 의 mRNA 발현량 확인

MCF7, MDAMB231 과 MCF7 #4, MDAMB231 #2 세포주들을 6 well 에 2×10^5 cell/well 로 분주한 후 48 시간 뒤에 TRIzol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 RNA 를 분리하였다. 분리한 RNA 는 PowerSYBR Green RNA-to-CT™ 1 Step Kit (Applied Biosystem, Foster, CA, USA)를 이용하여 real-time PCR 을 시행하였다.

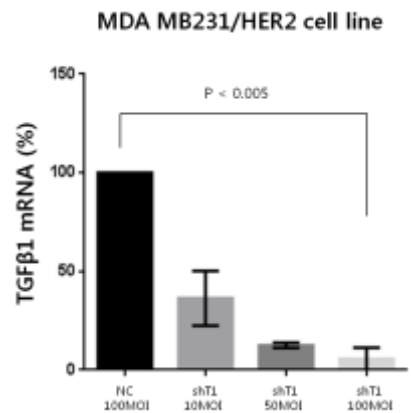
(A)



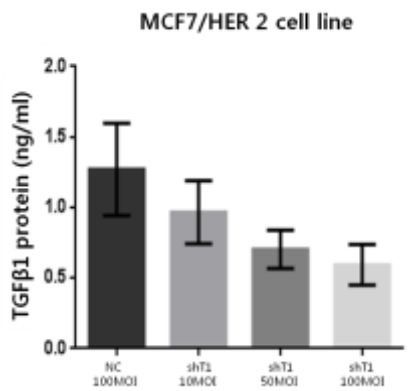
(B)



(C)



(D)



(E)

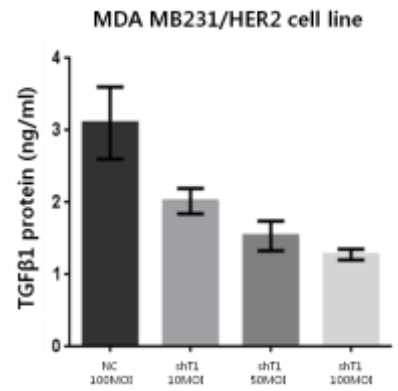


그림 5. TGFβ1 의 발현을 억제하는 복제 불능 아데노바이러스 제작 및 효과 확인

(A) shTGFβ1 을 발현하는 복제 불능 아데노바이러스 5 의 구조를

도식화한 그림이다.

<ITR; inverted terminal repeat, Ψ; packaging signal, U6; U6 promoter>

(B), (C) MCF7 #4, MDAMB231 #2 세포들을 6well 에 2×10^5 cell/well 로 분주한 후 다음날 NC, shTGFβ1 아데노바이러스를 10, 50, 100MOI 로 감염시켰다. 바이러스를 감염시키고 5 시간 후 배양액을 5% 우태아 혈청을 함유한 DMEM 배지로 바꿔주고, 48 시간 뒤에 TRIzol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 를 이용하여 RNA 를 분리하였다. 분리한 RNA 는 *PowerSYBR Green RNA-to-CT™ 1 Step Kit* (Applied Biosystem, Foster, CA, USA)를 이용하여 real-time PCR 을 시행하였다.

<NC; dl324-sh scrambled, shT1; dl324-human shTGFβ1>

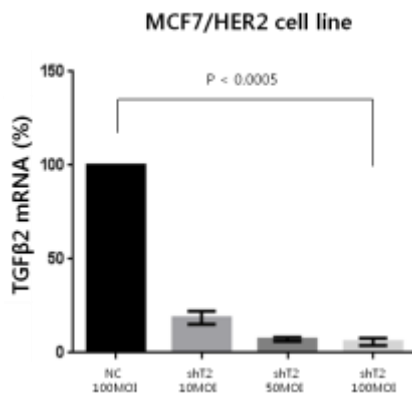
(D), (E) MCF7 #4, MDAMB231 #2 세포들을 6well 에 2×10^5 cell/well 로 분주한 후 다음날 NC, shTGFβ1 아데노바이러스를 10, 50, 100MOI 로 감염시켰다. 바이러스를 감염시키고 5 시간 후 배양액을 5% 우태아 혈청을 함유한 DMEM 배지로 바꿔주고, 하루 뒤에 혈청이 없는 배지로 교체한 뒤, 그 다음날 배지를 얻어 ELISA 를 시행하였다.

<NC; dl324-sh scrambled, shT1; dl324-human shTGFβ1>

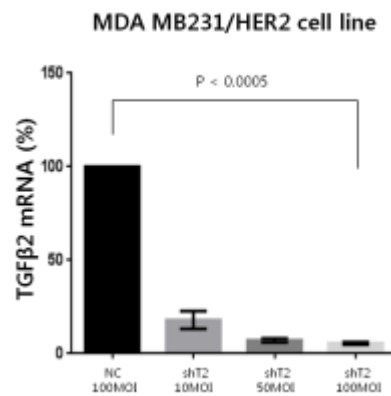
(A)



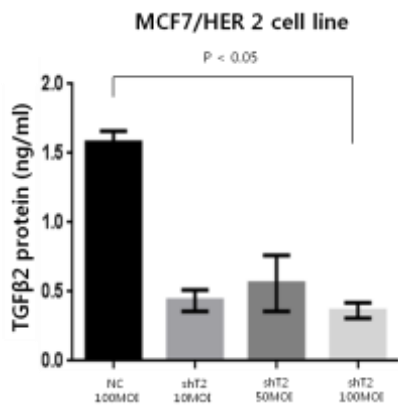
(B)



(C)



(D)



(E)

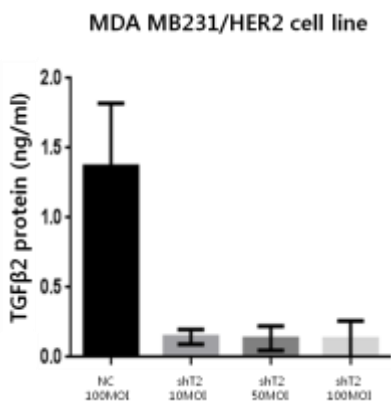


그림 6. TGFβ2 의 발현을 억제하는 복제 불능 아데노바이러스 제작 및 효과 확인

(A) shTGFβ2 를 발현하는 복제 불능 아데노바이러스 5 의 구조를 도식화한 그림이다.

<ITR; inverted terminal repeat, Ψ; packaging signal, U6; U6 promoter>

(B), (C) MCF7 #4, MDAMB231 #2 세포들을 6well 에 2×10^5 cell/well 로 분주한 후 다음날 NC, shTGFβ2 아데노바이러스를 10, 50, 100MOI 로 감염시켰다. 바이러스를 감염시키고 5 시간 후 배양액을 5% 우태아 혈청을 함유한 DMEM 배지로 바꿔주고, 48 시간 뒤에 TRIzol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 를 이용하여 RNA 를 분리하였다. 분리한 RNA 는 *PowerSYBR Green RNA-to-CT™ 1 Step Kit* (Applied Biosystem, Foster, CA, USA)를 이용하여 real-time PCR 을 시행하였다.

<NC; dl324-sh scrambled, shT2; dl324-human shTGFβ2>

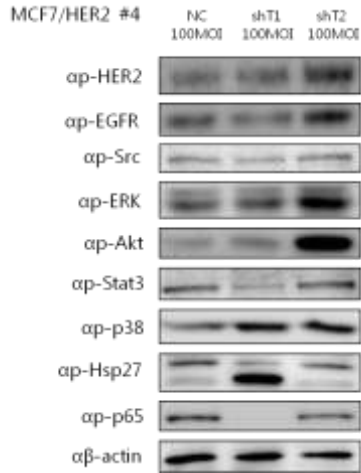
(D), (E) MCF7 #4, MDAMB231 #2 세포들을 6well 에 2×10^5 cell/well 로 분주한 후 다음날 NC, shTGFβ2 아데노바이러스를 10, 50, 100MOI 로 감염시켰다. 바이러스를 감염시키고 5 시간 후 배양액을 5% 우태아 혈청을 함유한 DMEM 배지로 바꿔주고, 하루 뒤에 혈청이 없는 배지로 교체한 뒤, 그 다음날 배지를 얻어 ELISA 를 시행하였다.

<NC; dl324-sh scrambled, shT2; dl324-human shTGFβ2>

바이러스는 효과가 있는 것을 확인하였다. 그 다음으로 TGFβ2 의 발현을 억제시키는 아데노바이러스를 제작하고(그림 6A), MCF7 #4, MDAMB231 #2 세포주에서 효과를 확인해 보았다(그림 6B~E). 위와 마찬가지로 shTGFβ2 를 발현하는 아데노바이러스를 MCF7 #4, MDAMB231 #2 세포주에 MOI 별로 감염시켜 세포의 TGFβ2 mRNA 와 단백질 발현량을 감소시키는지 확인하기 위하여 real-time PCR 과 ELISA 를 각각 시행하였다. 두 세포주에서 모두 10 MOI 를 처리하였을 때, 대조군보다 30% 이하로 mRNA 발현량이 감소한 것을 확인할 수 있었다. 50, 100MOI 에서는 바이러스양에 비례하여 더 많이 감소한 것으로 보였다(그림 6B, 6C). 바이러스를 처리하였을 때 TGFβ2 의 단백질 발현량도 감소한 것을 확인할 수 있었다(그림 6D, 6E). 따라서 shTGFβ2를 발현하는 아데노바이러스도 효과가 있는 것을 확인하였다. 그 다음으로 효과를 확인한 바이러스들을 MCF7 #4, MDAMB231 #2 세포주에 100 MOI 처리한 뒤 Western blot 을 시행하여 세포 내 신호전달 변화를 비교하였다(그림 7). MCF7 #4 세포주에서는 shTGFβ1 바이러스를 처리하였을 때 phospho-EGFR, phospho-Src, phospho-Stat3, phospho-p65 가 감소한 것으로 보여지고 phospho-Akt, phospho-p38, phospho-Hsp27 은 증가한 것으로 보였다. shTGFβ2 바이러스를 처리하였을 때에는 대조군과 변화가 없거나 phospho-HER2, phospho-EGFR, phospho-ERK, phospho-Akt, phospho-p38 은 증가한 것으로 확인되었다(그림 7A). MDAMB231 #2 세포주에서는 shTGFβ1 바이

러스를 처리하였을 때 phospho-HER2, phospho-EGFR, phospho-Src, phospho-Stat3, phospho-p65 가 감소한 것으로 보여지고 phospho-ERK, phospho-Akt, phospho-p38, phospho-Hsp27 은 증가된 것으로 확인되었다. shTGF β 2 바이러스를 처리 하였을 때에는 phospho-HER2, phospho-Src, phospho-Stat3 는 감소하는 것으로 보이지만 phospho-EGFR, phospho-p38, phospho-Hsp27, phospho-p65 는 대조군과 변화가 없고, phospho-ERK, phospho-Akt 는 shTGF β 1 바이러스를 처리하였을 때보다 증가한 것으로 보였다(그림 7B). 이 결과들을 바탕으로 shTGF β 1, shTGF β 2 바이러스 처리시 phospho-HER2 와 phospho-EGFR 의 발현량 이 많이 감소된 MDAMB231 #2 세포주에서 shTGF β 1, shTGF β 2 바이러스를 처리하였을 때 증식능에 어떠한 영향을 미치는지 알아 보기 위하여 군락형성분석을 시행하였다(그림 8). 대조군에 비하여 shTGF β 1 바이러스를 처리하였을 때 군락이 훨씬 적게 형성되어 있는 것을 확인하였다. 그러나 shTGF β 2 바이러스를 처리하였을 때에는 군락이 대조군보다 더 많이 형성되어있는 것으로 확인되었다. 따라서 MDAMB231 #2 세포주에서는 phospho-HER2 와 phospho-EGFR 을 모두 감소시키는 shTGF β 1 바이러스가 세포의 증식능을 감소시키는 것으로 확인되었다.

(A)



(B)

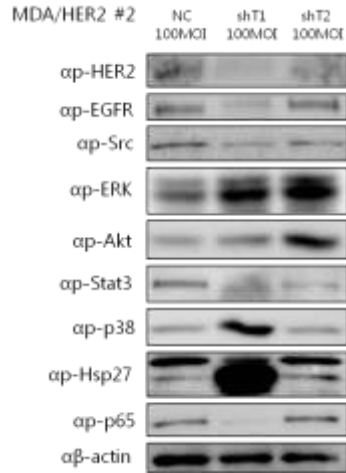


그림 7. HER2 유전자를 도입시킨 두 유방암 세포주에서 shTGFβ1과 shTGFβ2 바이러스 처리시 세포 내 신호전달 변화 비교

MCF7 #4, MDAMB231 #2 세포들을 6well 에 2×10^5 cell/well 로 분주한 후 다음날 NC, shTGFβ1, shTGFβ2 아데노바이러스를 100 MOI 로 감염시켰다. 바이러스를 감염시키고 5 시간 후 배양액을 5% 우태아 혈청을 함유한 DMEM 배지로 바꿔주고, 48 시간 뒤, 세포들을 이용하여 Western blot 을 시행하였다.

<NC; dl324-sh scrambled, shT1; dl324-human shTGFβ1, shT2; dl324-human shTGFβ2>

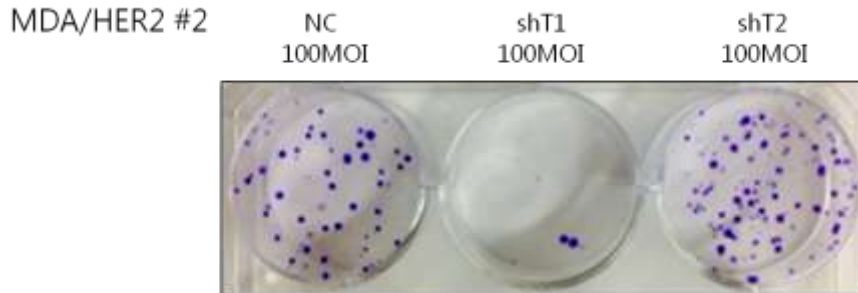


그림 8. MDAMB231 에 HER2 유전자를 도입시킨 세포주에서 shTGFβ1 과 shTGFβ2 바이러스 처리 후 군락형성능 확인

MDAMB231 #2 세포들을 6well 에 2×10^5 cell/well 로 분주한 후 다음날 NC, shTGFβ1, shTGFβ2 아데노바이러스를 100MOI 로 감염시켰다. 바이러스를 감염시키고 5 시간 후 배양액을 5% 우태아 혈청을 함유한 DMEM 배지로 바꿔주고, 이틀 후 세포들을 떼어내어 6well 에 1×10^5 cell/well 로 분주한 뒤 이틀에 한번씩 5% 우태아 혈청을 함유한 DMEM 배지로 배양액을 바꿔주었다. 10 일 후에 군락형성정도를 알아보기 위하여 배양액을 제거한 후 4% paraformaldehyde 를 상온에서 5 분간 처리하여 고정시켰다. 그리고 0.05% crystal violet 을 이용하여 1 시간 동안 염색 후 물로 세척하여 염색된 세포를 관찰하였다.

<NC; dl324-sh scrambled, shT1; dl324-human shTGFβ1, shT2; dl324-human shTGFβ2>

3. TGF β 1 과 EGF ligand 사이의 상관관계

EGFR 과 HER2 수용체의 주된 ligand 인 EGF 의 발현량을 MCF7, MDAMB231 과 MCF7 #4, MDAMB231 #2 세포주에서 ELISA 로 확인하였다(그림 9). MCF7 #4 세포주는 MCF7 에 비해 EGF ligand 발현량이 증가한 것으로 보였다. MDAMB231 #2 세포주도 MDAMB231 에 비해 EGF ligand 발현량이 증가한 것으로 보였고, MDAMB231 #2 세포주가 MCF7 #4 세포주보다 EGF ligand 발현량이 훨씬 많이 증가한 것으로 보였다. 따라서 위의 결과들을 바탕으로 MDA MB231 #2 세포주를 이용하여 앞으로의 실험을 진행하였다. 그 다음으로 MDAMB231 #2 세포주에서 TGF β 1 의 mRNA 발현량이 MDAMB231 모세포보다 증가되어 있는 것을 앞의 실험결과에서 확인하였고(그림 4C, 4D), 이 실험결과를 바탕으로 TGF β 1 을 감소시켰을 때 EGF ligand 발현량을 ELISA 로 확인하였다(그림 10). shTGF β 1 바이러스를 10MOI 로 처리하였을 때, 대조군의 EGF ligand 발현량에 비해 절반 이하로 감소한 것으로 보였다. 50, 100 MOI 에서는 발현량이 제로여서 그래프가 나타나지 않았다. TGF β 1 이 감소함에 따라 EGF ligand 발현량도 감소하는 것으로 보였다. TGF β 1 과 EGF ligand 사이에 직접적인 연관성이 있는지 확인하기 위하여 shTGF β 1 아데노바이러스에 의해 차단되었던 세포 내 신호 전달들이 EGF 단백질을 외부에서 처리하면 다시 연결되는지 (re-wiring) Western blot 을 통하여 확인하였다(그림 11). NC 와 shTGF

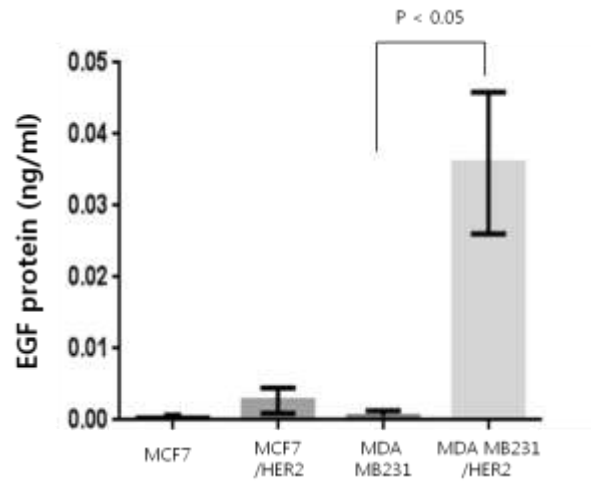


그림 9. MCF7, MDAMB231 과 각각의 HER2 유전자를 도입시킨 유방암 세포주에서 EGF ligand 발현량 확인

MCF7, MDAMB231 과 MCF7 #4, MDAMB231 #2 세포들을 6well 에 2×10^5 cell/ well 로 분주한 후 다음날 혈청이 없는 배지로 교체 한 뒤, 그 다음날 배지를 얻어 ELISA 를 시행하였다.

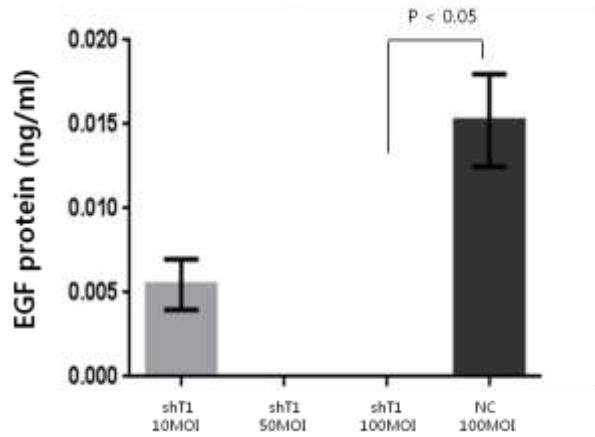
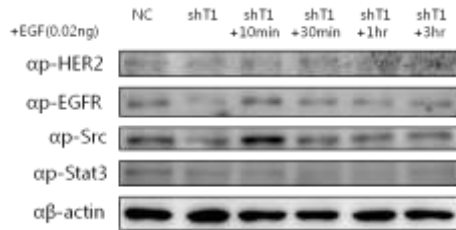


그림 10. shTGFβ1 바이러스 처리시 EGF ligand 발현량 확인

MDAMB231 #2 세포를 6well 에 2×10^5 cell/well 로 분주한 후 다음날 NC 와 shTGFβ1 바이러스를 10, 50, 100MOI 로 처리하였다. 바이러스 처리 5 시간 후 배양액을 5% 우태아 혈청을 함유한 DMEM 배지로 바꿔주고, 하루 뒤 혈청이 없는 배지로 교체한 뒤, 그 다음날 배지를 얻어 ELISA 를 시행하였다.

<NC; dl324-sh scrambled, shT1; dl324-human shTGFβ1>

(A)



(B)

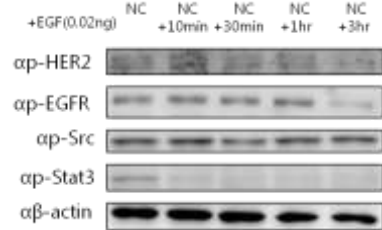


그림 11. 외부에서 EGF 단백질을 처리시 rewiring 확인

MDAMB231 #2 세포를 6well 에 2×10^5 cell/well 로 분주한 후 다음날 NC와 shTGF β 1 바이러스를 100MOI로 처리하였다. 바이러스 처리 5 시간 후 배양액을 5% 우태아 혈청을 함유한 DMEM 배지로 바꿔주고, 이를 후 각각의 시간별로 EGF 단백질을 외부에서 처리한 뒤 세포를 얻어 Western blot 을 시행하였다.

<NC; dl324-sh scrambled, shT1; dl324-human shTGF β 1>

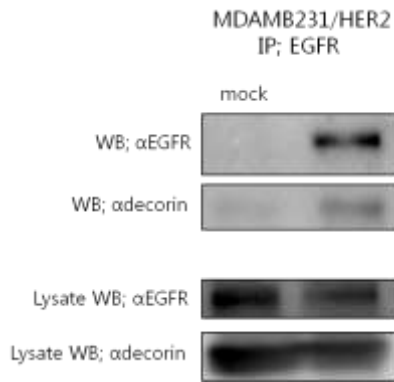
- $\beta 1$ 바이러스를 100 MOI 로 처리한 뒤 시간별로 EGF 단백질을 외부에서 처리하여 세포 내 신호전달 변화를 확인하였다(그림 11A). 대조군에 비해 shTGF $\beta 1$ 바이러스에 의해 감소되었던 세포 내 신호들이 EGF 단백질 처리시 회복되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 10 분 처리시 신호들이 가장 크게 회복되었고, 시간이 지날수록 조금씩 약해지는 것으로 보였다. 이에 대한 대조군으로 NC 바이러스를 100MOI 처리한 후 시간별로 EGF 단백질을 외부에서 처리하여 같은 방법으로 확인해 보았다(그림 11B). 그림 11A 와 다르게 NC 바이러스를 처리한 후 EGF 단백질을 처리하였을 때에는 별다른 변화가 나타나지 않았다. 따라서 shTGF $\beta 1$ 바이러스 처리시 대조군에 비해 감소되었던 신호들이 EGF 단백질을 외부에서 처리하면 다시 회복되는 것으로 보아 차단되었던 신호전달이 다시 연결되었다고 말할 수 있겠다. 위의 결과들을 바탕으로 TGF $\beta 1$ 이 EGF ligand 의 발현량을 직접적으로 조절하여 EGFR 과 HER2 를 통한 종양의 세포 내 신호전달에 영향을 미친다는 것을 확인하였다.

4. HER2 유전자를 도입시킨 유방암 세포주에서 decorin 아데노 바이러스의 효과 확인

Decorin 이 EGFR 의 ligand 로써 EGFR 에 결합하는지 면역침강법을 이용하여 확인하였다(그림 12A). EGFR 항체를 이용하여 면역침강을 하였고 Western blot 으로 EGFR 과 decorin 의 발현량을 확인하였다. 대조군은 면역침강시 β -actin 항체를 사용였고 따라서 대조군에서는 EGFR 과 decorin 발현량이 나타나지 않았다. EGFR 항체로 면역침강을 한 세포시료에서는 EGFR 과 decorin 의 발현량이 확인되었다. 같은 조건의 세포시료를 사용하였는지 확인하기 위하여 면역침강을 하지않은 세포시료에서 EGFR 과 decorin 의 발현량을 확인해 보았다. 대조군 세포시료와 실험군 세포시료 모두에서 EGFR 과 decorin 이 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 같은 조건의 시료를 사용하여 대조군과 비교하여 보았을 때 EGFR 과 decorin 은 결합한다고 보여진다. 위 결과를 바탕으로 decorin 이 EGFR 에 결합하여 EGF ligand 의 신호전달을 억제하면 그것이 TGF β 1 의 유전자 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인해보기 위하여, decorin 바이러스 처리시 TGF β 1 의 mRNA 발현량을 real-time PCR 로 확인하였다(그림 12B). decorin 바이러스를 처리하면 대조군에 비해 TGF β 1 mRNA 의 발현량이 약 40%정도 감소하는 것으로 확인되었다. 따라서 decorin은 EGF ligand 의 신호전달을 차단하고 차단된 신호에 의해서 TGF β 1 의 유전자 발현(gene expression)

ssion)이 어느 정도 억제된다는 것이 확인되었다. 그 다음으로 decorin이 종양의 혈관형성을 억제하는지 확인하기 위하여 decorin 바이러스 처리시 혈관형성인자들의 mRNA 발현량을 확인하였다. VEGFA는 혈관내피세포성장인자로써 잘 알려져 있고 HIF1 α 는 VEGFA의 발현을 조절한다고 알려져 있어 두 혈관형성인자들의 mRNA 발현량을 real-time PCR로 확인하였다(그림 13). VEGFA의 mRNA는 decorin 바이러스 처리시 약 40%정도 감소하는 것을 확인할 수 있었다(그림 13A). 그리고 HIF1 α 도 decorin 바이러스 처리시 mRNA 발현량이 약 30%정도 감소하였다(그림 13B). 따라서 decorin이 혈관형성인자의 발현을 어느 정도 억제함으로써 혈관형성을 억제할 것이라고 생각할 수 있겠다.

(A)



(B)

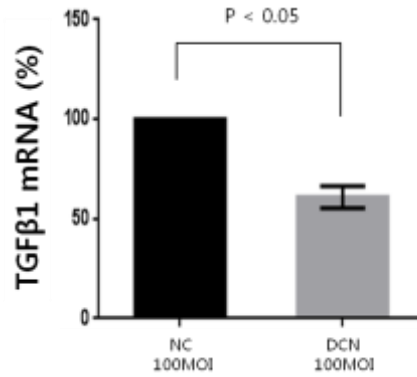


그림 12. EGFR 과 decorin 의 결합 확인 및 decorin 의 TGFβ1 억제제로서의 효과 확인

(A) MDAMB231 #2 세포를 100mm dish 에 4×10^6 개 분주한 다음 날 5% 우태아 혈청을 함유한 DMEM 배지를 이용하여 decorin 바이러스를 50MOI 처리하였다. 바이러스 처리 5 시간 후 배양액을 5% 우태아 혈청을 함유한 DMEM 배지로 바꿔주고, 2 일 후에 세포를 이용하여 면역침강법을 시행하였다.

<WB; Western blot, IP; Immunoprecipitation, mock; 대조군>

(B) MDAMB231 #2 세포를 6well 에 2×10^5 cell/well 로 분주한 후 다음날 NC 와 decorin 바이러스를 100MOI 로 처리하였다. 바이러스 처리 5 시간 후 배양액을 5% 우태아 혈청을 함유한 DMEM 배지로 바꿔주고, 48 시간 뒤에 TRIzol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 를 이용하여 RNA 를 분리하였다. 분리한 RNA 는 *Power*

SYBR Green RNA-to-CT™ 1 Step Kit(Applied Biosystem, Foster, CA, USA)를 이용하여 real-time PCR 을 시행하였다.

<NC; dl324-sh scrambled, DCN; dl324-human decorin>

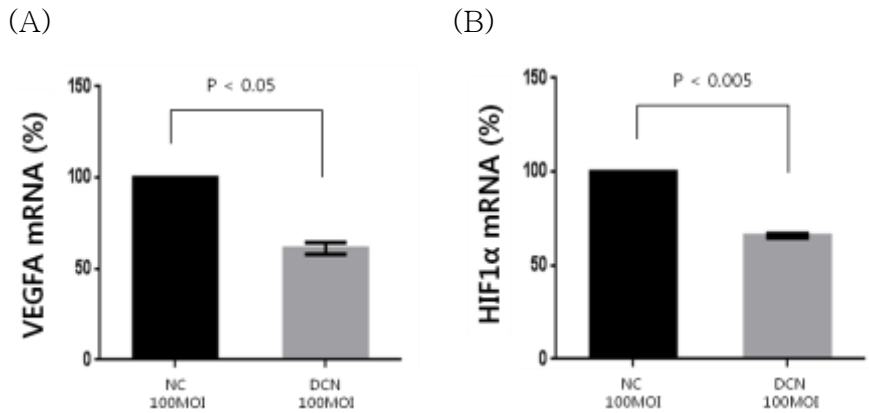


그림 13. Decorin 바이러스 처리시 혈관형성관련인자의 발현량 확인

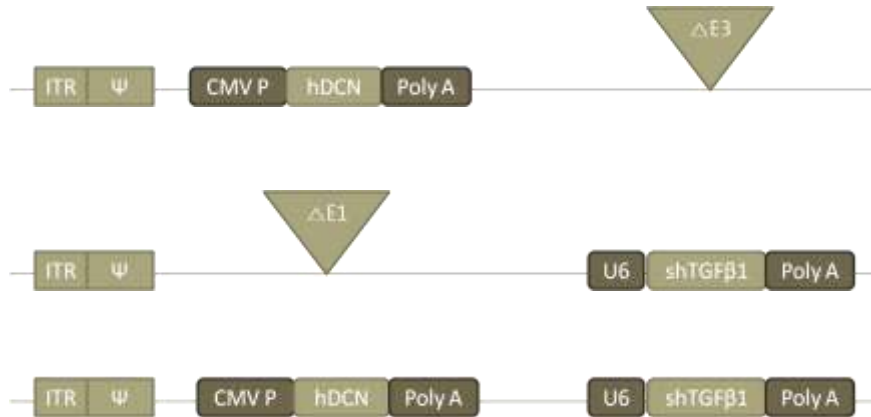
MDAMB231 #2 세포를 6well 에 2×10^5 cell/well 로 분주한 후 다음 날 NC 와 decorin 바이러스를 100MOI 로 처리였다. 바이러스 처리 5 시간 후 배양액을 5% 우태아 혈청을 함유한 DMEM 배지로 바꿔 주고, 48 시간 뒤에 TRIzol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 를 이용하여 RNA 를 분리하였다. 분리한 RNA 는 *Power* SYBR Green RNA-to-CT™ 1 Step Kit(Applied Biosystem, Foster, CA, USA)를 이용하여 real-time PCR 을 시행하였다.

<NC; dl324-sh scrambled, DCN; dl324-human decorin>

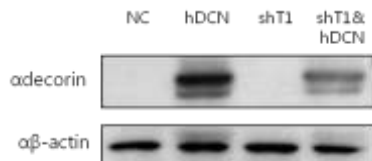
5. Decorin 의 발현을 유도하고, TGFβ1 의 발현을 감소시키는 아데노바이러스 제작 및 효과 확인

Decorin 과 shTGFβ1 을 발현하는 복제 불능 아데노바이러스를 제작하였다. 그림 14A 는 복제 불능 decorin 바이러스, shTGFβ1 바이러스, decorin 과 shTGFβ1 두 유전자를 발현하는 바이러스 각각을 도식화한 그림이다(그림 14A). 먼저 각각의 바이러스를 100 MOI 로 처리 후 Western blot 을 시행하여 decorin 의 발현여부를 확인하였다(그림 14B). decorin 을 발현하는 바이러스와 decorin 과 shTGFβ1 두 유전자를 발현하는 바이러스를 처리한 세포에서 decorin 이 발현되는 것을 확인하였다. 그러나 decorin 과 shTGFβ1 두 유전자를 발현하는 바이러스가 decorin 을 단독으로 발현하는 바이러스보다 decorin 발현량이 적은 것으로 보였다. 그 다음으로 각각의 바이러스를 100MOI 로 처리한 후 real-time PCR 을 시행하여 TGFβ1 의 mRNA 발현량을 확인하였다(그림 14C). 대조군에 비해 shTGFβ1 을 단독으로 발현하는 바이러스와 decorin 과 shTGFβ1 두 유전자를 발현하는 바이러스에서 확실히 TGFβ1 의 mRNA 발현량이 감소한 것을 확인할 수 있었다. 두 바이러스는 비슷한 양으로 TGFβ1 의 mRNA 발현량을 감소시키는 것으로 보였다. 또한 위의 결과처럼 decorin 도 TGFβ1 의 mRNA 를 어느 정도 감소시키는 것으로 확인되었다.

(A)



(B)



(C)

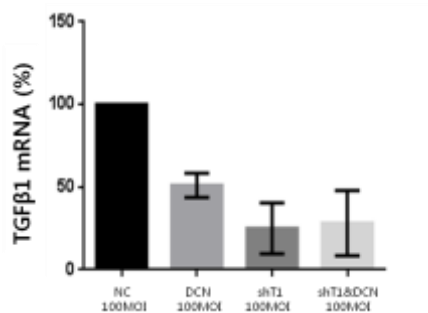


그림 14. Decorin과 shTGFβ1을 발현하는 복제 불능 아데노바이러스 제작 및 효과 확인

(A) 위에서부터 decorin과 shTGFβ1을 각각 단독으로 발현하는 복제 불능 아데노바이러스, decorin과 shTGFβ1 두 유전자를 발현하는 복제 불능 아데노바이러스를 도식화한 그림이다.

<ITR; inverted terminal repeat, Ψ; packaging signal, U6; U6 promoter, hDCN; human decorin>

(B) MDAMB231 #2 세포를 6well 에 2×10^5 cell/well 로 분주한 후 다음날 NC, decorin, shTGFβ1 을 단독으로 발현하는 바이러스와 decorin 과 shTGFβ1 두 유전자를 발현하는 바이러스를 각각 100 MOI 로 처리하였다. 바이러스 처리 5 시간 후 배양액을 5% 우태아 혈청을 함유한 DMEM 배지로 바꿔주고, 2 일 후에 세포를 이용하여 Western blot 을 시행하였다.

<NC; dl324-sh scrambled, hDCN; dl324-human decorin, shT1; dl324-human shTGFβ1, shT1 & hDCN; dl324-human decorin-human shTGFβ1>

(C) MDAMB231 #2 세포를 6well 에 2×10^5 cell/well 로 분주한 후 다음날 NC, decorin, shTGFβ1 을 단독으로 발현하는 바이러스와 decorin 과 shTGFβ1 두 유전자를 발현하는 바이러스를 각각 100 MOI 로 처리하였다. 바이러스 처리 5 시간 후 배양액을 5% 우태아 혈청을 함유한 DMEM 배지로 바꿔주고, 48 시간 뒤에 TRIzol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 를 이용하여 RNA 를 분리하였다. 분리한 RNA 는 *Power* SYBR Green RNA-to-CT™ 1 Step Kit(Applied Biosystem, Foster, CA, USA)를 이용하여 real-time PCR 을 시행하였다.

<NC; dl324-sh scrambled, DCN; dl324-human decorin, shT1; dl324-human shTGFβ1, shT1 & DCN; dl324-human decorin-

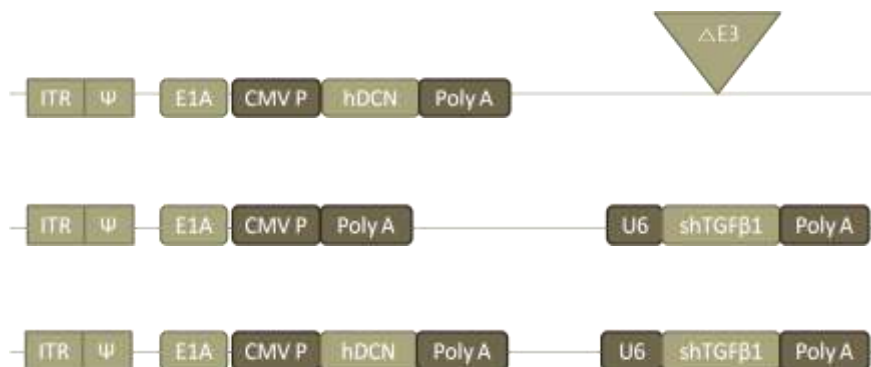
human shTGF β 1>

6. 동물실험을 통한 항종양 효과 확인

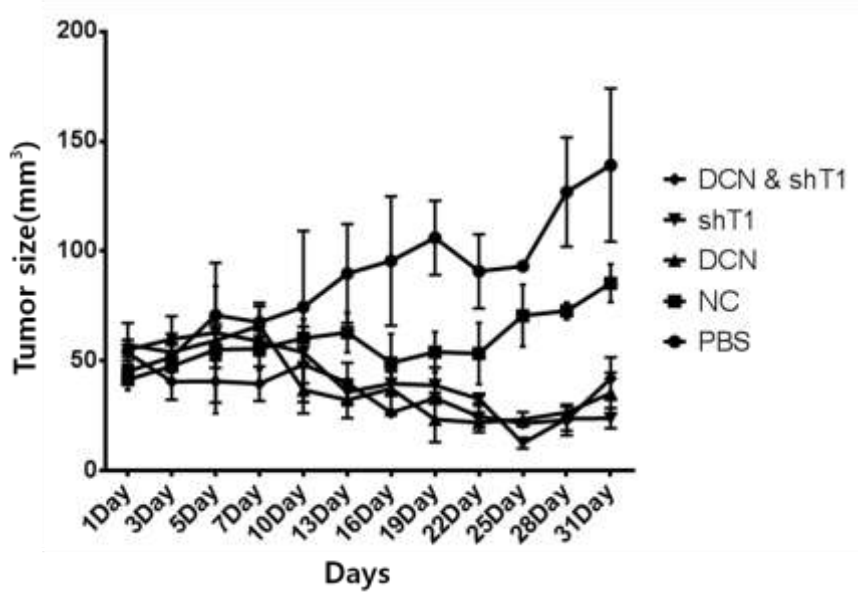
동물실험을 위하여 각각의 종양 선택적 살상 아데노바이러스를 제작하였다(그림 15A). 위에서부터 decorin 을 탑재한 바이러스, sh-TGF β 1 을 탑재한 바이러스, decorin 과 shTGF β 1 두 유전자를 탑재한 바이러스를 각각 도식화한 그림이다. 복제 불능 아데노바이러스와 다르게 앞쪽에 E1A 유전자가 삽입되어있다. 따라서 종양 세포 내에서 복제가 가능하다. 이 바이러스들을 이용하여 유방암 세포가 이식된 BALB/c nude 암컷 마우스에 각 그룹별로 총 3 회 주사하여 30 일 이상 관찰하였다(그림 15B). PBS 를 처리한 그룹은 시간이 지날수록 꾸준히 종양의 크기가 커지고 있고, NC 바이러스를 처리한 그룹은 PBS 를 처리한 그룹만큼은 아니지만, 유전자가 탑재된 바이러스를 처리한 그룹들에 비해 종양의 크기가 계속 커졌다. 그에 비해 decorin, shTGF β 1 을 각각 탑재한 종양 선택적 살상 아데노바이러스 그리고 decorin 과 shTGF β 1 두 유전자를 탑재한 종양 선택적 살상 아데노바이러스를 처리한 모든 그룹들은 시간이 지날수록 종양의 크기가 점점 감소하는 것을 볼 수 있었다. 그러나 하나의 유전자가 탑재된 바이러스를 처리한 그룹들과 두 개의 유전자가 탑재된 바이러스를 처리한 그룹간의 종양 크기 차이는 거의 나타나지 않은 것으로 보였다. 또한, decorin 이 아데노

바이러스 확산에 도움을 주어 바이러스의 효율을 높이는 역할을 할 것으로 생각되어 면역조직화학염색을 시행하여 효과를 확인해 보았다. 동물실험으로부터 유방암 조직을 얻어 아데노바이러스 5 항체를 이용하여 실험을 시행하였다(그림 15C). PBS 를 투여한 조직과는 다르게 종양 선택적 살상 아데노바이러스를 투여한 모든 조직에서 아데노바이러스 5 의 발현이 잘 관찰되었다. 그러나 decorin 이 포함된 바이러스를 처리한 그룹들에서 발현량이 더 강하거나, 넓게 관찰되지 않았다. 따라서 decorin 이 아데노바이러스의 확산에 도움을 준다는 것을 확인하지 못하였다.

(A)



(B)



(C)

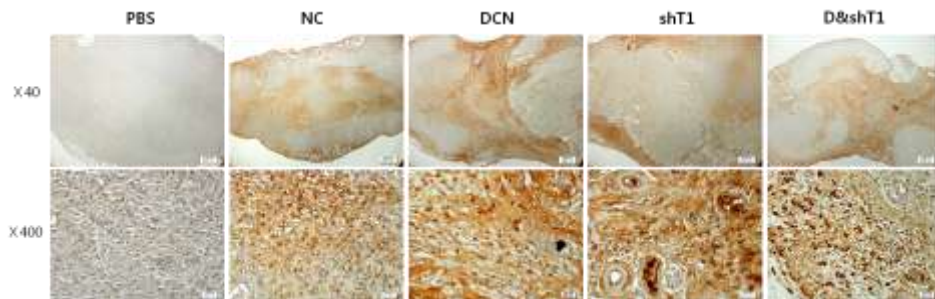


그림 15. 종양 선택적 살상 아데노바이러스 제작 및 동물실험에서의 효과

(A) 위에서부터 순서대로 decorin과 shTGFβ1를 탑재한 각각의 종양 선택적 살상 아데노바이러스, decorin과 shTGFβ1 두 유전자를 탑재한 종양 선택적 살상 아데노바이러스를 도식화한 그림이다.

<ITR; inverted terminal repeat, Ψ ; packaging signal, U6; U6 promoter>

(B) BALB/c nude 암컷에 세포를 $1 \times 10^7/100\mu\text{l}$ 씩 복벽에 피하주사 하였다. 암세포 이식 후 7 일 동안 암이 형성될 때까지 관찰하였고, 암의 크기가 50mm^3 정도로 성장하면 PBS, 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 dl324-sh scrambled, dl324-human decorin, dl324-human shTGF β 1, dl324-human decorin-human shTGF β 1 을 각각 1×10^8 PFU/ $50\mu\text{l}$ 용량으로 2 일에 한 번씩 총 3 회 종양 내로 투여 하였다. (1, 3, 5 일에 바이러스 투여) 그리고 3 일에 한번씩 종양 크기를 측정하였다.

(C) BALB/c nude 암컷에 MDAMB231 #2 세포를 $1 \times 10^7/100\mu\text{l}$ 씩 복벽에 피하주사 하였다. 암세포 이식 후 7 일경, 암의 크기가 50mm^3 정도로 성장하면 PBS, 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 dl324-sh scrambled, dl324-human decorin, dl324-human shTGF β 1, dl324-human decorin-human shTGF β 1 각각의 바이러스를 1×10^8 PFU/ $50\mu\text{l}$ 용량으로 2 일에 한 번씩 총 3 회 종양 내로 투여 하였다. (1, 3, 5 일에 바이러스 투여) 첫 번째 바이러스를 투여하고 7 일 후에 조직을 떼어내어 10% formaldehyde 로 하룻밤 동안 고정 시켰다. 파라핀조직은 항체를 사용하여 염색하였다. 사용된 항체는 adenovirus 5 를 이용하였다.

(Magnification: X40, X400)

IV. 고찰

본 연구에서는 EGFR과 HER2가 과발현되어 있는 유방암에서 혈관 형성을 억제하고 EGFR과 HER2에 의한 신호전달을 차단하며 바이러스의 확산 효율을 높여주는 decorin, 그리고 정상세포나 초기 암세포에서는 세포의 성장과 분화를 억제하지만 진행된 암에서는 성장과 전이를 촉진하고 특히 유방암에서는 EGFR과 HER2 등의 RTK 활성을 돕는 TGF β 1 유전자를 억제하는 shTGF β 1을 탑재한 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 항종양 효과를 검증하고자 하였다. TGF β 는 EGFR과 HER2를 통하여 Src을 활성화시키고 이로 인하여 Akt, Erk 신호에 영향을 주어 종양의 생존과 증식을 증가시킨다는 연구결과가 있고, Stat3는 Src에 직접적으로 영향을 받는 전사인자로 알려져 있다.^{32,36} 그래서 같은 세포이지만 EGFR 수용체만 발현하는 세포와 EGFR과 HER2 두 수용체를 발현하는 세포에서 이러한 신호전달을 확인하였다. Western blot을 시행하였을 때 특이한 점은 HER2 유전자를 도입시킨 세포주들에서 EGFR의 발현량이 모두 증가했다는 점이다(그림 1C, 1D). EGFR과 HER2가 모두 발현되면 heterodimer를 이루어 이를 통한 신호전달이 강해져 종양의 증식능력이 증가한다는 보고가 있다.³² 이러한 이유로 HER2가 발현되었을 때 EGFR과 HER2가 heterodimer를 이루면서 EGFR이 단백질 분해효소와 같은 효소들에 의한 생물적 분해가 덜 일어나 발현량이 증가한 것처럼 보이는 것으로 여겨진다. 다음으로 군락형성분석을 하여 기존의 세포주와 HER2 유전자를 도입시킨 유방암 세포주의 생존능을 비교하였을

때 MCF7과 MCF7 #4 세포주의 군락형성량이 MDAMB231과 MDA MB231 #2 세포주보다 적은 것은 세포의 성장속도가 느리기 때문이다(그림 2). 따라서 같은 양의 세포를 배양시켜 같은 시간 동안 관찰했기 때문에 세포의 성장속도가 느린 MCF7과 MCF7 #4 세포주의 군락형성량이 훨씬 적은 것이다. 또한 BT474 에서 shHER2 바이러스를 처리하였을 때 EGFR의 발현량이 감소되었다. 이것은 HER2 유전자를 도입시킨 세포주들에서 EGFR의 발현량이 증가하였던 결과와 같은 이유라고 생각된다. 다음으로 shTGF β 1 과 shTGF β 2 아데노바이러스를 MCF7 #4, MDAMB231 #2 세포주에 100MOI 처리한 뒤 Western blot을 시행하여 세포 내 신호전달 변화를 관찰한 실험에서 shTGF β 1 바이러스를 처리하였을 때 감소한 phospho-EGFR, phospho-Src과 phospho-Stat3 신호들과 달리 phospho-ERK나 phospho-Akt는 증가하는 것으로 보였다(그림 7). 외부의 스트레스에 의한 ERK의 활성화는 세포가 죽는 것을 유도하고 세포 주기를 억제시킨다는 보고들이 있다.^{37,38} 이러한 연구결과들을 바탕으로 대조군보다 활성화된 ERK의 발현은 종양 세포의 생존을 증가시키는 역할이 아닌 세포의 생존을 감소시키는 역할을 할 것으로 생각된다. 그러나 shTGF β 2 바이러스를 처리하였을 때에도 ERK가 활성화되어 있지만, 대조군에 비해 다른 세포 신호들에서는 활성화의 변화가 거의 나타나지 않아 shTGF β 2 바이러스 처리시 활성화된 ERK의 발현이 종양 세포의 생존에 미치는 영향은 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 Akt는 외부에서 자극이 주어졌을 때, 세포

를 보호하기 위하여 신호가 활성화된다는 연구들이 있다.³⁹ 그러나 전사인자로써 Akt에 의해 발현이 조절되며 활성화가 되어있으면 자가면역질환이나 암을 유발한다고 알려있는 NF- κ B (Nuclear factor - κ B, p65)⁴⁰의 인산화 형태(phospho-p65)는 발현량이 대조군에 비해 감소되어 있었다. 따라서 약간 증가된 phospho-Akt 의 발현은 TGF β 1의 감소로부터 세포를 보호하기 위한 작용으로 여겨지나 종양의 증식과 성장을 증가시키지 않는 것으로 생각된다. 이와 달리 shTGF β 2 바이러스 처리에 의한 phospho-Akt의 증가된 발현량은 shTGF β 1 바이러스 처리에 의해 증가된 발현량 보다 훨씬 많고, phospho-p65의 발현량도 감소되어 있지 않았다. 따라서 shTGF β 2 바이러스는 종양의 증식과 성장을 감소시키지 않는다고 생각된다. 또한 Akt와 관련되어 외부 스트레스에 반응하는 Hsp27과 그 상위 신호인 p38의 인산화 형태를 확인해본 결과 shTGF β 1 바이러스 처리시 증가되어 있는 것으로 나타났다. p38에 의해서 Hsp27이 인산화되면 종양의 증식과 성장을 억제한다는 내용의 보고들이 있다.^{41,42} 따라서 이러한 현상들은 phospho-EGFR, phospho-Src, phospho-Stat3의 신호가 감소한 것과 같은 맥락으로 이해할 수 있겠다. 그리고 MDAMB231 #2 세포주에서 shTGF β 1 바이러스와 shTGF β 2 바이러스를 처리하여 군락형성분석을 시행한 결과는 앞선 결과와 일치함을 보여주었다(그림 8). 생체 내에서 유전자가 탑재된 종양 선택적 살상 아데노바이러스에 의한 항종양 효과가 개선되는지 여부를 확인하기 위하여 동물실험을 진행하였을 때 7일 정도 까지는 그룹별 차이가 나타나지 않다가 PBS

그룹은 10일부터 서서히 증가하기 시작하여 계속 증가하는 경향을 보였다. NC 그룹은 어느 정도의 크기를 꾸준히 유지하다가 25일 이후부터 PBS 그룹과 마찬가지로 증가하는 것으로 나타났다. 그리고 각각의 decorin과 shTGF β 1을 탑재한 종양 선택적 살상 아데노바이러스 그룹들과 decorin, shTGF β 1 두 유전자가 탑재된 종양 선택적 살상 아데노바이러스 그룹은 꾸준히 종양의 크기가 감소하는 것으로 보였다. 그러나 감소하는 동안 세 그룹간의 차이는 거의 나타나지 않았으며 비슷한 효과를 보였다. 이러한 이유로는 먼저 decorin과 shTGF β 1의 항종양 효과가 비슷하기 때문이라고 생각한다. Decorin과 shTGF β 1은 공통적으로 EGFR과 HER2로부터 전달되는 신호를 차단하여 항종양 효과를 나타낸다. 또한 TGF β 1이 VEGFA를 발현시켜서 혈관형성을 촉진한다는 연구들이 있다.^{43,44} 그러므로 TGF β 1의 발현을 감소시키면 VEGFA의 발현을 억제시킴으로써 혈관형성을 억제하므로 decorin과 같은 효과를 나타낸다. 따라서 decorin과 shTGF β 1 두 유전자는 종양을 억제하는데 있어서 유사한 역할을 하기 때문에 하나의 유전자를 넣은 바이러스와 두 유전자를 넣은 바이러스에서 차이가 나타나지 않는 것으로 생각된다. 또 다른 이유로는 decorin이 바이러스의 확산에 도움을 준다는 것을 입증하지 못했기 때문이라고 생각한다. Decorin이 바이러스의 확산에 도움을 준다는 연구결과가 있어²⁵, 그러한 효과를 기대하고 동물실험에서 종양을 얻어 조직을 슬라이드로 제작하여 면역조직화학 염색을 하여 아데노바이러스 5의 발현량을 관찰하는 실험을 하였다 (그림 15C).

그러나 decorin이 바이러스의 확산에 도움을 준다는 것을 입증하지는 못했다. 이러한 효과를 관찰하지 못한 이유 중 하나로 종양 살상 아데노바이러스를 전달체로 사용한 점을 들 수 있겠다. 종양 살상 아데노바이러스가 세포에 감염되면 사이토카인과 케모카인들이 분비되어 선천면역인자들을 활성화시키고 감염된 세포로 모이도록 유도하며, 적응면역의 활성화를 유도한다는 연구결과들이 있다.^{45,46} 따라서 동물실험에서 사용한 마우스는 T 세포(T cell)를 생산할 수 없으므로 활성화된 선천면역인자들이 바이러스에 감염된 종양 세포들을 공격할 것이나, 형성된 종양의 내부로 들어오기는 어려울 것이고 주로 외부의 종양세포들이 공격을 받을 것으로 생각된다. 그러므로 확산된 바이러스들은 선천면역에 의한 공격을 받을 확률이 높아 지므로 decorin에 의한 바이러스 확산은 확인하기가 어려웠을 것으로 생각된다.

V. 결론

Decorin은 종양의 혈관형성을 억제하고 EGFR과 HER2에 작용하여 각각의 하위 신호전달을 차단하며 바이러스의 확산을 도와주는 작용을 한다고 알려져 있고, TGF β 는 정상세포나 초기 암세포에서는 세포의 성장과 분화를 억제하지만 진행된 암에서는 성장과 전이를 촉진하고 특히 유방암에서는 EGFR과 HER2 등의 RTK 활성을 돕는 역할을 한다고 알려져있다. 따라서 본 실험에서는 EGFR과 HER2가 발현되어있는 유방암에 아데노바이러스를 이용하여 decorin과 sh-TGF β 1 유전자를 전달하여 항종양 효과를 보고자 연구를 진행하였다. 복제가 가능한 종양 선택적 살상 아데노바이러스들을 제작하여 동물 실험을 진행하였고, 각각 decorin과 shTGF β 1을 탑재한 종양 선택적 살상 아데노바이러스 그리고 decorin, shTGF β 1 두 유전자를 탑재한 종양 선택적 살상 아데노바이러스 모두가 대조군에 비해 종양의 크기를 줄이는데 효과가 있는 것으로 확인되었다. 그러나 세 바이러스 간에 항종양 효과의 차이는 볼 수 없었다. 이러한 이유로는 decorin과 shTGF β 1의 항종양 효과가 비슷하고, decorin에 의한 바이러스의 확산 개선 효과가 뚜렷하지 못했기 때문이라고 생각된다. 앞으로 바이러스를 전달체로 여러 유전자를 도입시키는 연구에서는 서로 다른 항종양 효과를 나타내는 유전자를 사용하여 연구를 진행 한다면 더 효과적인 결과를 얻을 수 있을 것이라고 생각된다.

참고문헌

1. Addou-Klouche L, Adelaide J, Cornen S, Bekhouche I, Finetti P, Guille A, et al. Integrated genomic analysis of breast cancers. *Balkan J Med Genet* 2012;15:71-4.
2. Guo W, Pylayeva Y, Pepe A, Yoshioka T, Muller WJ, Inghirami G, et al. Beta 4 integrin amplifies ErbB2 signaling to promote mammary tumorigenesis. *Cell* 2006;126:489-502.
3. Milanezi F, Carvalho S, Schmitt FC. EGFR/HER2 in breast cancer: a biological approach for molecular diagnosis and therapy. *Expert Rev Mol Diagn* 2008;8:417-34.
4. Tateishi M, Ishida T, Kohdono S, Hamatake M, Fukuyama Y, Sugimachi K. Prognostic influence of the co-expression of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 protein in human lung adenocarcinoma. *Surg Oncol* 1994;3:109-13.
5. Shirakawa T. The current status of adenovirus-based cancer gene therapy. *Mol Cells* 2008;25:462-6.
6. Guo ZS, Thorne SH, Bartlett DL. Oncolytic virotherapy: molecular targets in tumor-selective replication and carrier cell-mediated delivery of oncolytic viruses. *Biochim Biophys Acta* 2008;1785:217-31.
7. Hamada K, Desaki J, Nakagawa K, Zhang T, Shirakawa T, Gotoh A, et al. Carrier cell-mediated delivery of a replication-competent adenovirus for cancer gene therapy. *Mol Ther* 2007;15:1121-8.
8. Zhou HS, Zhao T, Rao XM, Beaudet AL. Production of helper-dependent adenovirus vector relies on helper virus structure and complementing. *J Gene Med* 2002;4:498-509.
9. Rao L, Debbas M, Sabbatini P, Hockenbery D, Korsmeyer S, White E. The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:7742-6.
10. Yew PR, Liu X, Berk AJ. Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53. *Genes Dev* 1994;8:190-202.
11. Yew PR, Berk AJ. Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature* 1992;357:82-5.
12. Savelyeva I, Dobbelstein M. Infection with E1B-mutant adenovirus stabilizes p53 but blocks p53 acetylation and activity through E1A.

- Oncogene 2011;30:865-75.
13. Heise C, Sampson-Johannes A, Williams A, McCormick F, Von Hoff DD, Kirn DH. ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nat Med* 1997;3:639-45.
 14. Hobom U, Dobbstein M. E1B-55-kilodalton protein is not required to block p53-induced transcription during adenovirus infection. *J Virol* 2004;78:7685-97.
 15. Shim JS, Matsui Y, Bhat S, Nacev BA, Xu J, Bhang HE, et al. Effect of nitroxoline on angiogenesis and growth of human bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 2010;102:1855-73.
 16. Iozzo RV, Sanderson RD. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2011;15:1013-31.
 17. Bi XL, Yang W. Biological functions of decorin in cancer. *Chin J Cancer* 2013;32:266-9.
 18. Fan H, Sulochana KN, Chong YS, Ge R. Decorin derived antiangiogenic peptide LRR5 inhibits endothelial cell migration by interfering with VEGF-stimulated NO release. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:2120-8.
 19. Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res* 2005;65:3967-79.
 20. Baghy K, Iozzo RV, Kovalszky I. Decorin-TGFbeta axis in hepatic fibrosis and cirrhosis. *J Histochem Cytochem* 2012;60:262-8.
 21. Reed CC, Waterhouse A, Kirby S, Kay P, Owens RT, McQuillan DJ, et al. Decorin prevents metastatic spreading of breast cancer. *Oncogene* 2005;24:1104-10.
 22. Carpenter G. The EGF receptor: a nexus for trafficking and signaling. *Bioessays* 2000;22:697-707.
 23. Iozzo RV. The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins. *J Biol Chem* 1999;274:18843-6.
 24. Santra M, Reed CC, Iozzo RV. Decorin binds to a narrow region of the epidermal growth factor (EGF) receptor, partially overlapping but distinct from the EGF-binding epitope. *J Biol Chem* 2002;277:35671-81.
 25. Choi IK, Lee YS, Yoo JY, Yoon AR, Kim H, Kim DS, et al. Effect of decorin on overcoming the extracellular matrix barrier for

- oncolytic virotherapy. *Gene Ther* 2010;17:190–201.
26. Zhang X, Min KW, Liggett J, Baek SJ. Disruption of the transforming growth factor- β pathway by tolfenamic acid via the ERK MAP kinase pathway. *Carcinogenesis* 2013.
27. Kim SG, Song JY. Therapeutic targeting of oncogenic transforming growth factor- β 1 signaling by antisense oligonucleotides in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2012;28:539–44.
28. Ueda Y, Wang S, Dumont N, Yi JY, Koh Y, Arteaga CL. Overexpression of HER2 (erbB2) in human breast epithelial cells unmasks transforming growth factor β -induced cell motility. *J Biol Chem* 2004;279:24505–13.
29. Wang SE, Shin I, Wu FY, Friedman DB, Arteaga CL. HER2/Neu (ErbB2) signaling to Rac1-Pak1 is temporally and spatially modulated by transforming growth factor β . *Cancer Res* 2006;66:9591–600.
30. Moreno-Caceres J, Caja L, Mainez J, Mayoral R, Martin-Sanz P, Moreno-Vicente R, et al. Caveolin-1 is required for TGF- β -induced transactivation of the EGF receptor pathway in hepatocytes through the activation of the metalloprotease TACE/ADAM17. *Cell Death Dis* 2014;5:e1326.
31. Tsushima H, Kawata S, Tamura S, Ito N, Shirai Y, Kiso S, et al. High levels of transforming growth factor β 1 in patients with colorectal cancer: association with disease progression. *Gastroenterology* 1996;110:375–82.
32. Wang SE, Xiang B, Zent R, Quaranta V, Pozzi A, Arteaga CL. Transforming growth factor β induces clustering of HER2 and integrins by activating Src-focal adhesion kinase and receptor association to the cytoskeleton. *Cancer Res* 2009;69:475–82.
33. Oh S, Kim E, Kang D, Kim M, Kim JH, Song JJ. Transforming growth factor- β gene silencing using adenovirus expressing TGF- β 1 or TGF- β 2 shRNA. *Cancer Gene Ther* 2013;20:94–100.
34. Akhtar J, Wang Z, Zhang ZP, Bi MM. Lentiviral-mediated RNA interference targeting stathmin1 gene in human gastric cancer cells inhibits proliferation in vitro and tumor growth in vivo. *J Transl Med* 2013;11:212.
35. Ambesajir A, Kaushik A, Kaushik JJ, Petros ST. RNA interference: A futuristic tool and its therapeutic applications. *Saudi J Biol Sci* 2012;19:395–403.

36. Chen J, Elfiky A, Han M, Chen C, Saif MW. The role of Src in colon cancer and its therapeutic implications. *Clin Colorectal Cancer* 2014;13:5–13.
37. Cagnol S, Chambard JC. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *Febs j* 2010;277:2–21.
38. Tang D, Wu D, Hirao A, Lahti JM, Liu L, Mazza B, et al. ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *J Biol Chem* 2002;277:12710–7.
39. Kanagasabai R, Karthikeyan K, Vedam K, Qien W, Zhu Q, Ilangoan G. Hsp27 protects adenocarcinoma cells from UV-induced apoptosis by Akt and p21-dependent pathways of survival. *Mol Cancer Res* 2010;8:1399–412.
40. Bai D, Ueno L, Vogt PK. Akt-mediated regulation of NFkappaB and the essentialness of NFkappaB for the oncogenicity of PI3K and Akt. *Int J Cancer* 2009;125:2863–70.
41. Matsushima-Nishiwaki R, Takai S, Adachi S, Minamitani C, Yasuda E, Noda T, et al. Phosphorylated heat shock protein 27 represses growth of hepatocellular carcinoma via inhibition of extracellular signal-regulated kinase. *J Biol Chem* 2008;283:18852–60.
42. Nakashima M, Adachi S, Yasuda I, Yamauchi T, Kawaguchi J, Itani M, et al. Phosphorylation status of heat shock protein 27 plays a key role in gemcitabine-induced apoptosis of pancreatic cancer cells. *Cancer Lett* 2011;313:218–25.
43. Bertolino P, Deckers M, Lebrin F, ten Dijke P. Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders. *Chest* 2005;128:585s–90s.
44. Ferrari G, Cook BD, Terushkin V, Pintucci G, Mignatti P. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated apoptosis. *J Cell Physiol* 2009;219:449–58.
45. Muruve DA. The innate immune response to adenovirus vectors. *Hum Gene Ther* 2004;15:1157–66.
46. Prestwich RJ, Harrington KJ, Pandha HS, Vile RG, Melcher AA, Errington F. Oncolytic viruses: a novel form of immunotherapy. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008;8:1581–8.

Abstract

Anti-tumor effect of oncolytic adenovirus expressing
shTGF β 1 and decorin in breast cancer overexpressing of
EGFR and HER2

Suyeon Je

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Joo-Hang Kim)

Decorin is a small leucine-rich proteoglycan that suppresses tumor angiogenesis, promotes virus spreading, and inhibits EGFR and HER2 signaling. TGF β inhibits the growth and differentiation of normal cells and early cancer cells, but it stimulates the growth and metastasis of advanced cancer cells. In addition, TGF β is a strong promoter of RTK activity, including EGFR and HER2 signaling in breast cancer. In this study, the anti-tumor effect of an adenovirus-expressing decorin and shTGF β 1 on inhibiting cancer growth, survival, and angiogenesis, as well as the spreading capacity of the oncolytic adenovirus, was investigated using breast cancer cells overexpressing EGFR and HER2. Stable cell lines were produced by

inserting the HER2 gene into the MCF7 and MDAMB231 breast cancer cell lines expressing EGFR. Western blot analysis revealed increased proliferation, survival signals, and EGFR expression in both produced cell lines. A clonogenic assay revealed that the viability of the produced cell lines was greater than that of the original cell lines. To confirm these results, BT474 cells expressing EGFR and HER2 were infected with an shHER2-expressing virus. Decreased kinase activity, including proliferation and survival signaling, and decreased EGFR expression, were observed in the BT474 cells, indicating that EGFR and HER2 expression influence each other. Therefore, when both receptors display RTK activity, cell viability is increased. The shTGF1-expressing virus was also found to be more effective at decreasing proliferation than the shTGF2-expressing virus in the HER2-expressing MDAMB231 cell lines. In addition, all HER2-expressing cell lines displayed an increase in EGF ligand expression. In particular, the HER2-expressing MDAMB231 cell lines prominently expressed EGF. When the HER2-expressing MDAMB231 cell lines were infected with the shTGF β 1-expressing virus, a rapid decrease in EGF expression was observed by ELISA. Further, the signal inhibitory effect of the shTGF β 1-expressing virus was overcome by treated exogenous EGF. These results show that EGF is the main ligand for

EGFR and HER2 receptors and that it is regulated by TGF β 1. An subsequent immunoprecipitation experiment demonstrated a direct interaction between decorin and EGFR, and real-time PCR analysis revealed decreased TGF β 1 mRNA levels in the cells infected with the decorin-expressing virus. These findings support the theory that decorin functions as a competitive inhibitor of EGF by directly binding EGFR and inhibiting downstream signaling, which results in decreased TGF β 1 gene expression. Decorin was also found to decrease the expression of VEGFA and HIF1 α , indicating an angiogenesis inhibitory effect. Consequently, a virus expressing decorin and shTGF β 1 was produced and confirmed that increased decorin expression and decreased TGF β 1 expression. In addition, an oncolytic adenovirus was used in animal experiments to confirm its anti-tumor effect *in vivo*. Animal groups treated with the oncolytic adenovirus expressing decorin or shTGF β 1 or decorin-shTGF β 1 showed a greater decrease in tumor size than the PBS and NC treated controls. However, no differences were observed in the anti-tumor effect *in vivo* among animal groups treated with the oncolytic adenovirus expressing decorin or shTGF β 1 or decorin-shTGF β 1.

Key Words : EGFR, HER2, EGF, TGF β 1, Decorin, oncolytic adenovirus